

**Molekulare NIRF-Bildgebung von
Cholecystokinin₂-Rezeptor-exprimierenden
Tumoren: *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Elisabeth Laabs**

geboren am 7. August 1981 in Erfurt

Erster Gutachter: Prof. Dr. Ingrid Hilger, Jena

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Wendt, Jena

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Klaus J. Klose, Marburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 8. Dezember 2008

Abkürzungsverzeichnis

Fachausdrücke und Einheiten

ACN	Acetonitril
b.E.	Beliebige Einheiten
BF	Binningfaktor
BFCA	Bifunktionelle Chelator–Agents
bonSAI	Bio optical near infrared fluorescence Small Animal Imager
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BZ	Belichtungszeit
CCD	Charge-coupled Device
CCK	Cholecystokinin
CCK ₂ R	Cholecystokinin ₂ -Rezeptor
CLSM	Confocal Laser Scan Microscopy
CT	Computertomographie
DAPI	4',6- Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate

DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FisH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FKS	Fetales Kälberserum
FRI	Fluorescence reflectance imaging
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
i. v.	intravenös
ICG	Indocyaningrün
MRT	Magnetresonanztomographie
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIR	Nahes Infrarot
NIRF	Nah-Infrarot-Fluoreszenz
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
p.i.	Post injectionem
RGD	Arginin-Glycin-Aspartam
ROI	Region Of Interest
RNA	Ribonukleinsäure
SCID	Severe combined immunodeficiency
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomographie

SSC	Side scatter (Seitwärtsstreulicht)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TFA	Trifluoressigsäure
VIP	Vasointestinales Peptid
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
Zielsetzung	16
3 Material	18
3.1 Substanzen	18
3.1.1 Der Nahinfrarotfarbstoff DY-676	18
3.1.2 Das Peptid Mingastrin	19
3.1.3 Die verwendeten Zelllinien	19
3.1.4 Sonstige Substanzen	20
3.2 Verbrauchsmaterial	22
3.3 Geräte	24
3.3.1 Das NIRF-Bildgebungsinstrument bonSAI	24
3.3.2 Sonstige Geräte	27
4 Methoden	29
4.1 Vorversuche mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument bonSAI	29
4.1.1 Phantomversuche mit Schweinefleisch	29
4.1.2 Phantomversuche mit Eigelb	30
4.2 Herstellung der spezifischen Sonde	30
4.2.1 Kopplung von DY-676 an Minigastrin	30
4.2.2 Aufreinigung der Sonde mittels HPLC	31
4.2.3 Bestimmung der Peptidkonzentration	32
4.3 <i>in vitro</i> - Zellversuche	33
4.3.1 Zellkultur	33
4.3.2 PCR-Analyse	35
4.3.2.1 RNA-Isolierung	35
4.3.2.2 Reverse Transkription	35
4.3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
4.3.2.4 Agarosegelelektrophorese	38
4.3.3. NIRF-Darstellung der CCK ₂ R-Expression verschiedener Zelllinien nach Inkubation mit der spezifischen Sonde	39
4.3.3.1 Bestimmung der Fluoreszenzintensität der Zellen mit dem NIRF-	

Bildgebungsinstrument bonSAI.....	39
4.3.3.2 FACS-Analyse.....	40
4.3.3.3 CLS-Mikroskopie	41
4.4 NIRF-Bildgebung von CCK ₂ -Rezeptor exprimierenden Tumoren <i>in vivo</i>	42
4.4.1 Die verwendeten Versuchstiere	42
4.4.2 Implantation von Tumorzellen in SCID-Mäuse	42
4.4.3 Messung der Fluoreszenzintensitäten der Tumoren und Organe mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument bonSAI nach i.v.-Injektion der Sonde	43
4.5 Statistische Auswertung der semiquantitativen Fluoreszenzintensitäten	45
5 Ergebnisse	46
5.1 Vorversuche mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument bonSAI	46
5.1.1 Phantomversuche mit Schweinefleisch	46
5.1.2 Phantomversuche mit Eigelb	48
5.2 Charakterisierung der spezifischen Sonde	50
5.3 <i>in vitro</i> - Zellversuche	51
5.3.1 Nachweis der CCK ₂ R-Expression der verschiedenen Zelllinien auf mRNA-Ebene	51
5.3.2 Darstellung der CCK ₂ R-Expression verschiedener Zelllinien nach Inkubation mit der spezifischen Sonde.....	52
5.3.3.1 NIRF-Darstellung der CCK ₂ R-exprimierenden Zellen mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI.....	52
5.3.3.2 Nachweis der CCK ₂ R-Expression mittels FACS-Analyse	56
5.3.3.3 Nachweis der CCK ₂ R-Expression mittels CLS-Mikroskopie.....	58
5.4. NIRF-Bildgebung von CCK ₂ R-exprimierenden Tumoren <i>in vivo</i>	60
5.4.1 Detektion der CCK ₂ R-exprimierenden Tumoren in SCID-Mäusen	60
5.4.2 Abschätzung der Biodistribution der spezifischen Sonde.....	67
6 Diskussion	70
6.1 Parametercharakterisierung zur NIRF-Bildgebung in Vorversuchen	70
6.2 Charakterisierung der spezifischen Sonde	72
6.3 <i>in vitro</i> - Zellversuche	73
6.4 NIRF-Bildgebung von CCK ₂ R-exprimierenden Tumoren <i>in vivo</i>	75
7 Literaturverzeichnis	85
8 Anhang	92

1 Zusammenfassung

Etwa 200 000 Menschen sterben jährlich an einer malignen Tumorerkrankung. Eine wichtige Voraussetzung für eine frühe Tumordiagnostik und somit effiziente Behandlung der Erkrankung stellt die diagnostische Bildgebung dar. Die so genannten klassischen Bildgebungsverfahren wie Röntgen, Sonografie, CT und MRT bieten dabei eine gute Darstellung der anatomischen Lage eines Tumors, geben jedoch keine Auskunft über seine zelluläre und molekulare Struktur. Die erst in den letzten Jahren entwickelte molekulare Bildgebung wird voraussichtlich diese Informationen auf Zellebene und damit eine Diagnostik im frühen Tumorstadium bieten können. Dabei macht sie sich zum Nutzen, dass Zellen, welche entarten, zumeist eine verstärkte Expression von Rezeptoren auf ihrer Oberfläche zeigen. Diese können durch die selektive Anbindung einer signalgebenden Verbindung an Reportermoleküle, welche an die Rezeptoren binden, mit einem dafür geeigneten Detektionssystem dargestellt werden. Die zur molekularen Bildgebung gehörenden szintigrafischen Verfahren gehen mit der radioaktiven Belastung des Patienten und der Umwelt einher. Hingegen wird dank der neu entwickelten und bisher präklinisch und tierexperimentell durchgeführten optischen Bildgebung unter Nutzung von Fluorophor-haltigen Kontrastmitteln und Licht, v.a. im Nah-Infrarot-Bereich (NIR), eine einfachere und schonendere molekulare Bildgebung erreicht. Durch die Bindung von Fluorophoren an entsprechende Rezeptorliganden entsteht eine spezifische Sonde. Ein Beispiel für einen solchen Liganden ist das Peptid Minigastrin, welches an Cholecystokinin₂-Rezeptoren (CCK₂R) bindet. Diese Rezeptoren werden von einer Vielzahl von Tumoren, wie z.B. dem medullären Schilddrüsenkarzinom, dem kleinzelligen Bronchialkarzinom oder dem stromalen Ovarialkarzinom ausgebildet. In der vorliegenden Arbeit wurde eine CCK₂R-spezifische Sonde mit Hilfe der Kopplung von Minigastrin an einen neu entwickelten NIR-Fluoreszenzfarbstoff hergestellt, welche die Darstellung von CCK₂R-positiven Zellen und Tumoren mit einem planaren biooptischen NIR-Fluoreszenz-Bildgebungsinstrument ermöglichte. Um dies zu erreichen, wurden zunächst Phantomversuche durchgeführt, welche das Fluorophor in Verbindung mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument charakterisierten. Anschließend wurden in *in vitro*-Zellversuchen zunächst humane Karzinomzellen mit Hilfe von PCR-Analysen auf eine mögliche CCK₂-Rezeptor-Expression untersucht. Die Zellen wurden darauf mit dem neu entwickelten

Kontrastmittel inkubiert und ihre Fluoreszenzintensitäten mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument ermittelt. Die Überprüfung dieses neuen Verfahrens mit Hilfe von etablierten Methoden wie FACS und CLSM zeigte dabei eine Übereinstimmung mit den mit dem Bildgebungsinstrument erzielten Ergebnissen. Die in den *in vitro*-Versuchen untersuchten Zellmodelle wurden anschließend für die *in vivo*-Versuche genutzt, welche den Hauptteil der vorliegenden Arbeit bildeten. Dafür wurden die Zellen in SCID-Mäuse implantiert und ein Anwachsen von Tumoren mit etwa 0,5 cm Durchmesser bewirkt. Im Anschluss wurden die SCID-Mäuse nach i.v.-Applikation der spezifischen Sonde über 24h mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument untersucht. Dabei gelang die Darstellung der CCK₂R-positiven Tumoren mit Tumor/Muskel-Verhältnissen der Fluoreszenzintensität von 1,7 (direkt nach Sondenapplikation) bis 1,5 (8 h p.i.) und eine Abgrenzung zu CCK₂R-negativen Tumoren bzw. zu solchen, deren CCK₂-Rezeptoren mit ungekoppeltem Mingastrin besetzt waren. Die Abgrenzung des CCK₂R-positiven Tumors zu beiden Kontrollen war 4 und 8 h nach Sondeapplikation signifikant ($p < 0,05$). Ebenso konnte durch die Messung der Tumor- und Organfluoreszenzen *ex vivo* die Bioverteilung der Sonde abgeschätzt werden, wobei vor allem ein Abbau der Sonde über die Niere und Leber der SCID-Mäuse und eine Anreicherung der Sonde im Gastrointestinaltrakt (GIT) beobachtet wurden. Für die Anwendung der Sonde ist demzufolge auf eine ausreichende räumliche Trennung der darzustellenden Tumoren vom GIT zu achten, wie sie z. B. bei der Darstellung des medullären Schilddrüsenkarzinoms gegeben wäre. Andere Organe wie Lunge, Herz und Milz zeigten dagegen kaum einen Anstieg ihrer Fluoreszenz nach Injektion der Sonde, wobei vor allem die verhältnismäßig geringe Anreicherung in der Lunge für die Darstellung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms von Vorteil ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass mit einer neuartigen Fluorophor-haltigen Sonde und dem innovativen planaren NIRF-Bildgebungsinstrument eine frühzeitige Diagnostik von CCK₂R-exprimierenden Tumoren *in vivo* möglich ist. Eine Optimierung der Tumordarstellung wie zum Beispiel das Erlangen höherer Tumor/Muskel-Verhältnisse der Fluoreszenzintensität und eine bessere Abgrenzung des Tumors zu Nachbarstrukturen kann dabei durch die Anwendung der Sonde in tomografischen optischen Bildgebungssystemen bzw. eine chemische Modifizierung der Sonde erreicht werden. Auch ein Einsatz in Verbindung mit klassischen Bildgebungsmethoden und damit verbundene Präzisierung der gesamten Tumordiagnostik ist denkbar.

2 Einleitung

Auch im Jahr 2005 war, wie das Statistische Bundesamt Wiesbaden mitteilte (Pressemitteilung des statistischen Bundesamts vom 15.9.2006), die Erkrankung an bösartigen Neubildungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland nach den Herzkreislauferkrankungen. Ungefähr ein Viertel aller Gestorbenen (112 066 Männer und 99 330 Frauen) erlag damit einem Krebsleiden. Die meisten Männer starben an malignen Tumoren der Verdauungsorgane (36 022 Verstorbene) und der Atmungsorgane (30 629 Verstorbene). Bei den Frauen waren ebenfalls die bösartigen Neubildungen der Verdauungsorgane mit 32 563 Sterbefällen von Bedeutung, gefolgt von bösartigen Neubildungen der Brustdrüse mit 17 455 Sterbefällen.

Man spricht von maligner Neubildung, wenn Zellen eines Gewebes entarten, sich schnell teilen, verdrängend wachsen und damit das umliegende Gewebe schädigen sowie sich über das Gefäß- oder Lymphsystem ausbreiten und in anderen Organen Tochtergeschwülste (Metastasen) bilden. Durch die Schädigung der Organe in Folge des Tumors kommt es zu einem Funktionsausfall dieser und somit zum Krankheitsprozess und Tod des Patienten.

Die wichtigste Maßnahme zur Erhöhung der Überlebensrate bei Krebspatienten ist die frühzeitige Tumordiagnostik. Abgesehen von Vorsorgeuntersuchungen und Zufallsbefunden werden die meisten malignen Tumoren jedoch erst nach dem Auftreten von Symptomen diagnostiziert. In diesem Stadium ist das Tumorwachstum meist schon fortgeschritten und die Therapiemöglichkeit somit beschränkt. Je nach Symptomschilderung wird der Patient klinisch und laborchemisch bzw. per Biopsie untersucht.

Ein sehr wichtiges Hilfsmittel in der Tumor-Diagnostik ist die Bildgebung. Hiermit kann nicht nur die Lage des Tumors und die Tumorgroße, sondern auch seine Ausbreitung und Metastasierung nicht-invasiv sichtbar gemacht werden und die entsprechend beste Therapie (operative Tumorentfernung, Chemo-, Radiotherapie etc.) gewählt werden. Mit der bisherigen so genannten „klassischen“ Bildgebung wie Röntgen, Computertomografie, Sonografie und Magnetresonanztomografie können anatomische und pathomorphologische Strukturen im menschlichen Körper dargestellt werden. In den letzten Jahren wurde zudem die molekulare Bildgebung, wie z.B. die szintigrafische Bildgebung wie PET (positron emission computed tomography) und SPECT (single photon emission computed

tomography) entwickelt. Darüber hinaus wird die optische Bildgebung gegenwärtig intensiv erforscht. Die molekulare Bildgebung zeichnet sich dadurch aus, dass durch sie nicht nur die anatomische Lage eines Tumors dargestellt wird, sondern sie zugleich biologische Informationen über den Tumor bietet, da sie auf Zellebene stattfindet. Somit kann ein Tumor schon zu Beginn der Entartung der Zellen, also im frühen Wachstumsstadium, diagnostiziert werden (Weissleder und Mahmood, 2001). Das heißt, dass Sterblichkeit und Behandlungskosten gegenüber einer relativ späten Diagnostik eines metastasierten Tumors deutlich verringert werden können.

Das Prinzip der Molekularen Bildgebung beruht auf dem Markieren von Reportermolekülen, wie z.B. Peptiden, Antikörpern, mit Radionukliden für SPECT und PET bzw. Fluoreszenzfarbstoffen für die optische Bildgebung. Man nutzt dabei die Tatsache, dass eine maligne Transformation von Zellen häufig zu einer erhöhten Expression von definierten Rezeptoren auf der Zelloberfläche führt. Es wird also ein für diese Rezeptoren spezifisches Kontrastmittel, die so genannte molekulare Sonde, hergestellt. Die dazu verwendeten molekularen Sonden müssen eine hohe Affinität zu ihrer Zielstruktur besitzen und biologische Barrieren wie Gefäß- oder Zellmembranen passieren können. Mit Hilfe eines geeigneten Detektionssystems, können die Reporter dann an dem Ort ihrer Bindung an einen spezifischen Rezeptor bzw. an der Stelle ihrer Verstoffwechselung in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung sichtbar gemacht werden (siehe Schema in Abb. 1). Als Detektionssysteme dienen in diesem Fall Gammakameras bei der szintigrafischen Bildgebung bzw. Systeme mit Laser und CCD (engl.: *charged-coupled device* - hoch sensitive, ladungsträgergekoppelte)-Kamera bei der optischen Bildgebung. Mit Hilfe der molekularen Bildgebung können somit molekulare Abnormalitäten, welche die Basis für Krankheiten bilden, auf Proteinebene bildgebend dargestellt werden. Letztendlich kommt es dadurch zu einer früheren Detektion und Charakterisierung der Krankheiten und einer möglichen früheren Therapie. Außerdem besteht die Möglichkeit Therapieeffekte genau zu beobachten und ein besseres grundsätzliches Verstehen von Krankheitsprozessen zu erreichen (Weissleder und Mahmood 2001). Die aktuelle wissenschaftliche Forschung befasst sich zurzeit damit, eine Vielzahl von so genannten Zielproteinen (molecular targets) mit Hilfe der molekularen Bildgebung auf ihre Eignung für Diagnostik und Therapie (Tumortargeting) zu überprüfen (Ballou et al., 1997). Diese enge Verknüpfung von Diagnostik und Therapie wird auch als Theranostik bezeichnet (Opderbeck, 2002).

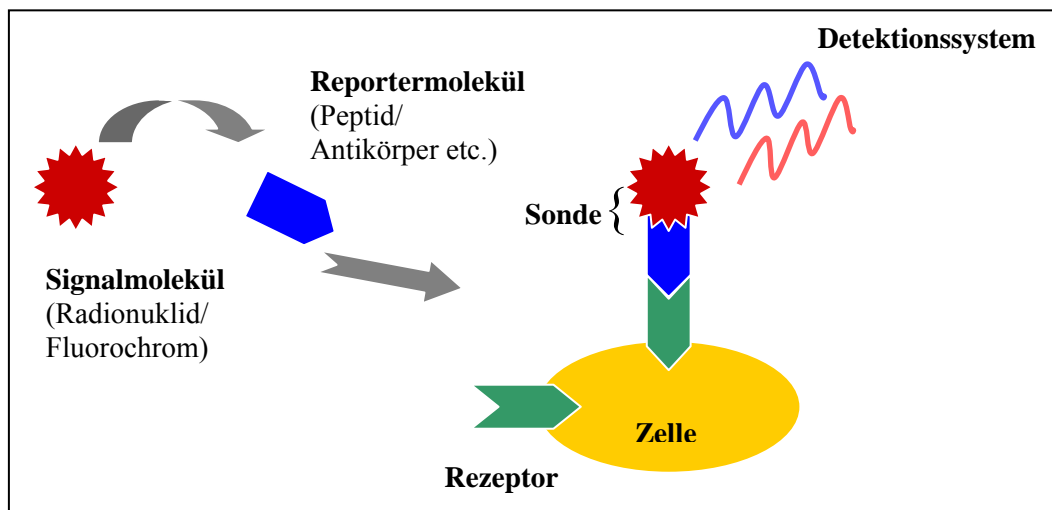


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Prinzips der Molekularen Bildgebung

Durch die Kopplung eines Reportermoleküls an ein Signalmolekül entsteht die spezifische Sonde, welche an einen von der Zelle exprimierten Rezeptor bindet. Mit Hilfe eines geeigneten Detektionssystems ist somit die Darstellung der Zelle auf molekularer Ebene möglich.

Bei jedem diagnostischen Verfahren ist zu beachten, wie stark es sich auf die Gesundheit des Patienten auswirken kann. So geht die szintigrafische Bildgebung mit der Belastung des Patienten durch radioaktive Isotope einher. Innerhalb der Nuklearmedizin wurden die höchsten effektiven Strahlungs Dosen für PET-Untersuchungen bzw. Myokard-, Gehirn- und Knochenszintigraphien mit Werten von 8,6; 7,0; 5,8 bzw. 5,1 mSv je Untersuchung ermittelt (Regulla, 2003). Weitere Nachteile der Szintigrafie sind die Erzeugung radioaktiven Abfalls und die notwendigen Maßnahmen zum Gewährleisten des Strahlenschutzes wie z.B. die Hintergrundmessung der Strahlung und Kontrolle der Fensterlage von nuklearmedizinischen Anlagen (Maul, 2003). Allerdings ermöglicht sie im Gegensatz zur optischen Bildgebung eine Ganzkörperdarstellung, wobei die genaue Lokalisation der bildgebenden Struktur erschwert ist. Die optische Bildgebung unter Nutzung von Fluoreszenz ist ein im Vergleich zur Szintigrafie wesentlich schonenderes und weniger aufwendigeres Verfahren der molekularen Bildgebung.

Den technischen Weiterentwicklungen in den 70er- und 80er Jahren des 20. Jahrhunderts, welche zu CCD-Kameras führten, sowie weiteren Entwicklungen auf dem Gebiet der Photonengenerierung und Photonendetektion, ist es zu verdanken, dass die Diagnostik mit Licht, die so genannte optische Bildgebung, in den vergangenen Jahren große Fortschritte machte. Zu diesem Fortschritt auf Seiten der optischen Detektionsgeräte kam die Entwicklung optischer Signalmoleküle, vor allem der Fluorophore, hinzu (Bremer et. al., 2001).

Bei der optischen Bildgebung wird vorrangig das Prinzip der Fluoreszenz genutzt. Damit ist gemeint, dass Elektronen bestimmter Moleküle nach Anregung mit Licht Photonen absorbieren, wodurch sie ein höheres Energieniveau erreichen und anschließend auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurückfallen. Die so frei werdende Energie wird dann als Licht ausgesandt, welches energieärmer als das Anregungslicht, also demzufolge längerwellig ist. Durch die Verschiebung von kurzwelligem zu langwelligem Licht, die als Stokes-Verschiebung bezeichnet wird und meistens 20 – 50 nm beträgt, ist es mittels Auswahl bestimmter Filter möglich, Fluoreszenz zur Bildgebung zu nutzen (Angelmahr 2003, Linkenheld 2002). Bei den Untersuchungen innerhalb der optischen Bildgebung werden zum derzeitigen Forschungsstand vor allem planare Bildgebungssysteme verwendet. Die auch als *fluorescence reflectance imaging* (FRI) bezeichnete planare Bildgebung basiert auf fotografischen Verfahren. Reflektierte bzw. emittierte Photonen von Oberflächenstrukturen werden mit einer CCD-Kamera ausgelesen und binnen weniger Sekunden zu einem digitalen Bild verarbeitet. Wenn für die FRI Fluorophore, Nah-Infrarot-Licht und die Überlagerung mit Weiß- oder Laserlicht eingesetzt werden, kann mittels FRI eine Auflösung im Mikrometerbereich erreicht werden (Bremer et al., 2001). Damit steht ein sehr einfaches, schnelles und schonendes Bildgebungsverfahren zur Verfügung, welches z.B. im Rahmen von endoskopischen Vorsorgeuntersuchungen als Screeningmethode denkbar ist. So sind zum Beispiel zurzeit Fluoreszenzendoskope für die Detektion von Krankheiten im Kolon, in der Lunge und in Blutgefäßen in der Entwicklung (Becker et al., 2001). Ebenfalls ist die planare Bildgebung einsetzbar im Rahmen von endoskopischen Operationen z.B. bei Hirntumoren bzw. zur Detektion von tieferen Hautläsionen. Zu den Grenzen der planaren Bildgebung zählt die relativ geringe Eindringtiefe in das Gewebe (siehe unten), die Reflexion von Licht an glatten Oberflächen, sowie das nichtlineare Verhältnis zwischen Signalstärke und optischen Gewebeeigenschaften. Die detektierte Fluoreszenz wird nicht nur vom verwendeten Fluorochrom, sondern auch von der Absorption und Lichtstreuung im Gewebe bestimmt, daher wird eine absolute quantitative Auswertung der planaren Bildgebung erschwert (Ntziachristos et al., 2005). Da die Absorption des Lichts im Gewebe, bedingt durch die Interaktion mit Zellmembranen und –organellen, in Abhängigkeit von seiner Wellenlänge variiert, ist zum Verringern dieser Probleme die Wahl der Lichtwellenlänge entscheidend. So kann z.B. sichtbares Licht Gewebe nur wenige Millimeter penetrieren, da es von Hämoglobin und Myoglobin stark absorbiert wird. Licht im Nahinfrarotbereich (NIR-Bereich) mit Wellenlängen von 650 bis 1000 nm erreicht dagegen eine maximale

Eindringtiefe von mehreren Zentimetern, da die Absorption durch Hämoglobin, Melanin, Fett und Wasser relativ gering ist (Sevick-Muraca et al., 2002). Man bezeichnet diesen Wellenlängenbereich auch als „diagnostisches Fenster“ (Abb.2) (Bremer et al., 2001).

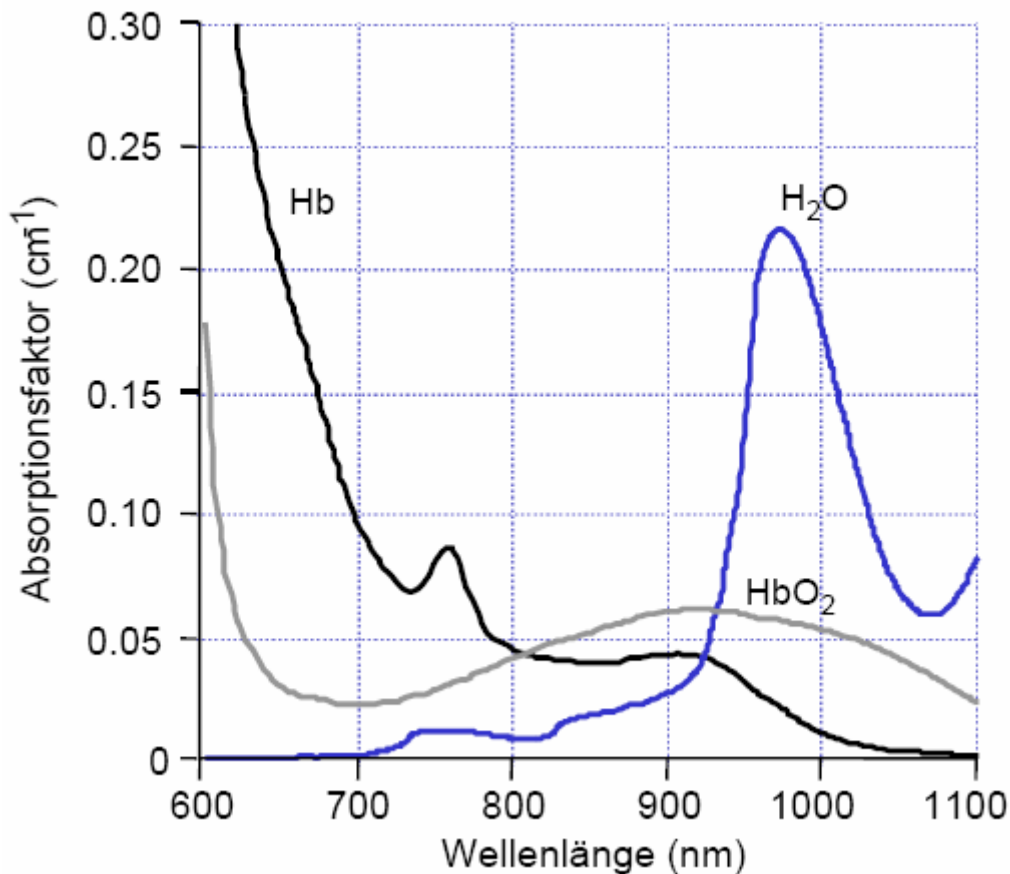


Abb.2: „Diagnostisches Fenster“: Absorptionsspektren von oxygeniertem (HbO₂), desoxygeniertem Hämoglobin (Hb) und Wasser im nahinfraroten Wellenlängenbereich (650-1000nm) (Quelle: Dissertation Sarah Bhargava, Berlin, 2002)

Nah-Infrarot-Licht wurde bisher klinisch schon erfolgreich mit Hilfe der optischen Tomografie zur Detektion von Karzinomen der Brust eingesetzt (Tromberg et al., 2005). Dabei wurde Indocyaningrün (ICG) als unspezifisches Kontrastmittel verwendet. Wegen seiner Eindringtiefe durch Haut, subkutanes Fettgewebe und Schädelknochen wird NIR-Licht im Rahmen von NIR-Spektroskopie in der Neurologie und Kardiochirurgie zur Untersuchung der Hirnfunktionen nach und während Operationen (Gratton et al., 2005, Taillefer und Denault, 2005), in der Neonatologie zur Untersuchung der Gehirne Neugeborener (Hebden 2003) und in der Sportmedizin zur Untersuchung der Muskelenergetik (Ferrari et al., 2004) genutzt.

Für tomografische Verfahren in der optischen Bildgebung sind bisher nur vereinzelt Geräte verfügbar. Außerdem ist hierfür ein hoher technischer Konstruktionsaufwand notwendig, da dem Verfahren eine Detektion von Photonenabsorptionen aus verschiedenen Projektionsrichtungen und die theoretisch berechnete Vorhersage des Wegs der Photonen durch das Gewebe zu Grunde liegt. Über das Berechnen der Absorptions- und Streuungsmuster der Photonen und ihre Detektion durch eine CCD-Kamera, der entsprechende Filter vorgeschaltet werden, lässt sich ein dreidimensionales Bild rekonstruieren (Bremer et al., 2001, Ntziachristos et al., 2005).

Die in der optischen Bildgebung genutzten Fluorophore sind Farbstoffe, welche die Fähigkeit besitzen, zu fluoreszieren. Da biologische Systeme, insbesondere im NIR-Bereich, eine sehr geringe Eigenfluoreszenz aufweisen, führt der Einsatz von Fluorophoren in der molekularen optischen Bildgebung zu einer guten Abgrenzbarkeit von der zu detektierenden Region zu ihrem Umgebungsgewebe und damit zu einem hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) (Bremer et al., 2001).

Verschiedene Anforderungen werden an Fluorophore gestellt: Sie sollten zum einen stabil gegenüber der Änderung des pH-Werts sein. So war beispielsweise die Emission des Fluoresceins, eines der ersten zur Tumorbildgebung an Antikörper gekoppelten Fluorophore, noch stark pH-abhängig, da es über die Änderung des pH-Werts verschiedene protolytische Stufen durchläuft (Martin und Lindqvist, 1975). Daraufhin wurden die Cyaninfarbstoffe entwickelt, deren Fluoreszenz unsensibel gegenüber pH-Werten von 4 bis 9 ist (Ballou et al., 1997). Eine andere nötige Voraussetzung für eine gute Detektion von Fluorophoren ist eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute, d.h. die Aussendung vieler Photonen nach Anregung (Bremer et al., 2001). Außerdem sollten sie für die Herstellung klinisch einsetzbarer Kontrastmittel wasserlöslich sein. Auch eine so genannte Photosensibilität, d.h. der Zerfall von Farbstoffen wie z.B. Methyl-Aminolevulinen in zytotoxische Abbauprodukte durch die Einwirkung von Licht, welche bei der photodynamischen Therapie zur Vernichtung von Malignomzellen genutzt wird, ist für Fluorophore in der optischen Bildgebung unerwünscht. Eine weitere Anforderung an Fluorophore ist eine möglichst hohe Photostabilität, da Fluorophore einen Verlust der Fluoreszenzfähigkeit durch einen Defekt im Fluoreszenzmolekül, bedingt durch Wechselwirkung mit Photonen (Photobleaching), erleiden können. Weiterhin charakteristisch für Fluorophore ist, dass sich bei Einsatz zu hohen Konzentrationen ihre Fluoreszenz auslöscht, man nennt dieses Phänomen Self-Quenching. Es erklärt sich durch

die hohe Anzahl an Zusammenstößen, denen die Moleküle ausgesetzt sind. Bei jeder Kollision mit einem anderen Teilchen erfolgt ein strahlungsloser Übergang, das heißt die Energie wird nicht in Form von Licht sondern in Form von Wärme freigesetzt. Damit sinkt folglich die Fluoreszenz der Farbstoffe in Abhängigkeit zu ihrer Konzentration (Hopt, 2004). Durch Quenching können also bei Verwendung von zu hohen Fluorochromkonzentrationen falsch negative Ergebnisse entstehen. Man kann Quenching jedoch auch nutzen. Werden beispielsweise relativ hohe Mengen an Fluorophoren an ein makromolekulares Trägermolekül gekoppelt, kommt es durch ihre räumliche Nähe zueinander durch gegenseitigen Energietransfer zur fast vollständigen Fluoreszenzauslöschung. Wird dieses Kontrastmittel dann in einen Organismus eingebracht und über Proteasen, die z.B. von Tumoren freigesetzt werden, aufgespalten, werden die Fluorophore freigesetzt und ein optisches Signal ist detektierbar (Dequenching). Diese so genannten aktivierbaren Kontrastmittel sind bisher schon erfolgreich im Tierversuch zur Detektion subkutan gelegener Malignome eingesetzt worden (Bremer et al., 2001). Sie sind ebenso voraussichtlich einsetzbar bei Erkrankungen, die ebenfalls mit Proteasen vergesellschaftet sind, wie z.B. Infektionen, Entzündungen sowie kardiovaskulären und degenerativen Erkrankungen (Weissleder und Mahmood, 2001).

Die bereits erwähnten Cyaninfarbstoffe erwiesen sich bisher als gut geeignet für die Anwendung als optische Kontrastmittel. Dabei wurden Cyaninfarbstoffe für Emissionsspektren von blauem Licht bis Ferninfrarotlicht (Cy2, Cy3, Cy5, Cy5.5 und Cy7) entwickelt (Ballou et al., 1997). Der Cyaninfarbstoff Indocyaningrün (ICG) wird schon seit 1956 in der Klinik zum Test der hepatischen Funktionen, zur Fluoreszenzangiographie und Ophthalmologie eingesetzt (Szeimies et. al., 2001, Licha et al., 2000). Erste Studien zeigten die Machbarkeit von Tumordetektion mittels ICG, so z.B. die Detektion von Mammakarzinomen im Tierversuch und beim Menschen (Licha et al., 2000). Ntziachristos et al. (2000) verglichen dafür die Detektion von Mammakarzinomen mittels Magnetresonanztomografie nach Gadoliniumgabe mit der tomografischen NIR-Bildgebung nach Injektion von ICG. Insgesamt konnte eine gute Korrelation der Ergebnisse beider Bildgebungsmethoden im Bezug auf Detektionsgenauigkeit und erreichten Kontrast der Karzinome zum Umgebungsgewebe gezeigt werden.

Ein weiterer, neuer Nah-Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff ist der von der Firma DYOMICS GmbH, Jena, entwickelte DY-676. Dieser gehört zu der Gruppe der Hemicyaninfarbstoffe, welche im Gegensatz zu Indocyaningrün eine geringere zytotoxische Wirkung aufweisen (Hilger et al., 2004). Da der Farbstoff Sulfonyl-Gruppen besitzt ist er sehr gut wasserlöslich und optimal für die Kopplung an Antikörper und Peptide geeignet. Er ist u. a. als freie Säure und in Form eines NHS-Esters verfügbar, durch welchen diese Kopplung an entsprechende Reporter zum spezifischen Nachweis von zellulären Markern möglich wird. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 674 nm und sein Emissionsmaximum bei 699 nm.

Die Nutzung von Peptiden als Reportermoleküle in der molekularen Bildgebung weist verschiedene Vorteile gegenüber derer von Antikörpern auf, welche bereits häufig in der Literatur beschrieben (Liu und Edwards, 1999, Serafini 1993) wurde. Zu den verschiedenen Limitationen der molekularen Tumor-Bildgebung mit Hilfe von Antikörpern zählen Immunreaktionen des Körpers und lange Plasmahalbwertszeiten der Antikörper, welche zu niedrigen Tumor/Rausch-Verhältnissen während der ersten Stunden nach der Injektion führen (Goldsmith, 1997). Des Weiteren wurde von Transportbarrieren in soliden Tumoren beim Einsatz von Antikörpern berichtet (Jain, 1994). Die Kopplung von Radionukliden oder Fluorophoren an rekombinante Antikörperfragmente (Neri et al., 1997) bzw. an kleine Peptide (<10 kD), welche als Rezeptorliganden fungieren, kann diese Schranken beheben (Sevick-Muraca et al., 2002). Zu den Vorteilen von Peptiden gehören außerdem deren einfache und preiswertere Synthetisierung und chemische Modifizierung, die einfache Kopplung an Chelatoren und Kontrastmittel, hohe Affinität in der Rezeptorbindung und schnelle Clearance (Langer und Beck-Sickinger, 2001, Reubi 2003). Die schnelle Proteolyse von Peptiden im Plasma durch endogene und exogene Peptidasen kann durch chemische Modifizierung der Peptide verringert werden. So können Peptide zum Beispiel gegen den Abbau durch exogene Peptidasen durch Acetylierung des N-Terminus, Amidierung oder Reduktion des C-Terminus und N-zu-C-Zyklisation resistent gemacht werden. Der Abbau durch Endopeptidasen kann anhand von Veränderungen der Peptidsequenz durch den Einbau von D-Aminosäuren, Aminosäuresurrogaten, Austausch von Amino- mit Iminogruppen u. v. a. vermindert werden (Langer und Beck-Sickinger, 2001).

Die Pharmakokinetik der Peptide ist vor allem von ihrer Größe, Lipophilität und Ladung abhängig. So werden größere, lipophilere und negativ geladene Peptide eher von der Leber

durch hepatobiliäre Exkretion ausgeschieden, während kleinere, hydrophile, positiv geladene durch glomeruläre Filtration in den Nieren aus dem Plasma entfernt werden (Langer und Beck-Sickinger, 2001).

Vorraussetzung der molekularen Bildgebung von Tumoren durch Peptide ist die Überexpression der entsprechenden Rezeptoren durch die Tumorzellen (Langer und Beck-Sickinger, 2001). Heterogene Rezeptorpopulationen resultieren in einer Verminderung der Sensitivität (Liu und Edwards, 1999). Eine Vielzahl von Rezeptoren und deren Darstellung durch Peptide sind aus der szintigrafischen Bildgebung bekannt. Dazu gehören vor allem die Darstellung von Somatostatinrezeptoren durch Somatostatinanaloga, sowie die Darstellung von VPAC-Rezeptoren (abgeleitet von PACAP: *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*) mittels Vasointestinalen Peptids (VIP). Ebenso wurde die Radionuklid-Markierung von Rezeptoren für die Bindung des Gastrin Releasing Peptids durch Bombesin, von Cholecystokinin₁-Rezeptoren durch Cholecystokinin und von Cholecystokinin₂-Rezeptoren durch Gastrin und v.a. beschrieben (Langer und Beck-Sickinger, 2001, Reubi 2003).

Die Anwendung von Peptiden in der szintigrafischen Bildgebung wurde schon teilweise in die optische Bildgebung übertragen. So konnten zum Beispiel mittels eines fluorochrommarkierten Octreotats Somatostatin-Rezeptor-exprimierende Tumoren nachgewiesen werden (Achilefu et al., 2000, Licha et al., 2000). Auch der epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor, welcher von einer Vielzahl von epithelialen Tumoren, wie z.B. dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom überexprimiert wird, konnte mittels fluorochrom-markierten Peptids in Tumor tragenden Mäusen gezeigt werden (Sevick-Muraca et al., 2002, Ke et al. 2003). Mehrfach beschrieben wurde auch die Darstellung von Integrin- $\alpha_v\beta_3$ durch fluorochrom-gekoppeltes RGD-Peptid (von Wallbrunn et al., 2006, Li et al., 2006, Ye et al., 2006). Ebenfalls ist die Verwendung von Bombesin (Achilefu, 2002) und VIP (Becker et al., 2000, Bhargava 2002) als molekulare Liganden in der optischen Bildgebung von Bombesin- bzw. VPAC₁-Rezeptoren berichtet worden.

Der oben bereits erwähnte Cholecystokinin₂-Rezeptor wird von verschiedenen Karzinomen exprimiert und eignet sich somit zur molekularen Tumor-Bildgebung. Sein Name lässt sich auf das Peptid Cholecystokinin zurückführen, welches erstmals im Gastrointestinaltrakt entdeckt (Ivy und Oldberg, 1928) und für Pankreas-Sekretion und Gallenblasen-Kontraktion verantwortlich gemacht wurde. Später wurde Cholecystokinin auch im Zentralnervensystem durch Vanderhaeghen et al. entdeckt (1975). Es wurden zwei

verschiedene Cholecystokinin-bindende Rezeptoren beschrieben, zum einen der CCK-A-Rezeptor, welcher zuerst in Azinuszellen des Pankreas gefunden wurde, und zum anderen der CCK-B-Rezeptor, welcher zunächst im Zentralnervensystem lokalisiert wurde (Noble et al., 1999). Dabei wurde ermittelt, dass der CCK-A-Rezeptor sulfatiertes Cholecystokinin mit 500- bis 1000-mal höherer Affinität als unsulfatiertes Cholecystokinin oder Gastrin bindet, wohingegen der CCK-B-Rezeptor Cholecystokinin und Gastrin mit vergleichbarer Affinität bindet. Gastrin, ein 1905 von Edkins entdecktes Peptid-Hormon des Magen-Darm-Trakts, gleicht dem Cholecystokinin in den 5 C-terminalen Aminosäuren und unterscheidet sich von ihm durch Sulfatierung am 6. Tyrosylrests (Edkins 1905, Dockray et al., 2001). Entgegen der Annahme, dass CCK-B-Rezeptoren des ZNS und die Gastrin-Rezeptoren des Magens zwei unterschiedliche Rezeptortypen seien (Menozzi et al., 1989), wurde über verschiedene molekularbiologische Methoden nachgewiesen, dass der Gastrin-Rezeptor dem CCK-B-Rezeptor entspricht (Noble et al., 1999). Da die Gen-Sequenz des CCK-A-Rezeptors im Gegensatz zu der des CCK-B-Rezeptors zuerst kloniert wurde, werden die Rezeptoren nach neuer Nomenklatur als CCK₁- und CCK₂-Rezeptoren bezeichnet. Beide Rezeptoren gehören zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Sieben-Transmembran-Rezeptoren (siehe Abb. 3). Sie unterscheiden sich nicht nur in ihrer Bindung an CCK und Gastrin, sondern teilweise auch in ihrem Vorkommen. So kommen CCK₁-Rezeptoren neben dem ZNS, in den Azinuszellen des Pankreas, D-Zellen und Hauptzellen des Magens und in der glatten Muskulatur von Gallenblase, Pylorus-Sphincter u. v. a. vor. Dahingegen sind CCK₂-Rezeptoren in den Parietal-, Enterochromaffin-ähnlichen (ECL), D- und Haupt-Zellen der Magenschleimhaut, in den glatten Muskelzellen des gesamten Gastrointestinaltrakts einschließlich der Gallenblase, sowie in Azinuszellen des Pankreas und in Monozyten und T-Lymphozyten lokalisiert (Noble et al., 1999). Eine Vielzahl von Tumoren exprimieren CCK₂-Rezeptoren und könnten somit mittels Detektion durch eine CCK₂-Rezeptor-spezifische Sonde diagnostiziert werden. Reubi et al. untersuchten verschiedene Tumoren auf das Vorhandensein von CCK₂-Rezeptoren mit Hilfe der Rezeptor-Autoradiografie, und haben vor allem in medullären Schilddrüsen-Karzinomen, kleinzelligen Bronchial-Karzinomen, in stromalen Ovarial-Karzinomen und Astrozytomen Rezeptoren detektiert (Reubi et al., 1997). Beim medullären Schilddrüsenkarzinom stellt die Darstellung von CCK₂-Rezeptoren einen großen Vorteil gegenüber der Darstellung von Somatostatin-Rezeptoren dar, da für den CCK₂-Rezeptor im Gegensatz zum Somatostatin-Rezeptor eine Unabhängigkeit des Rezeptorstatus vom Grad der Tumordifferenzierung bekannt ist. Dagegen exprimieren zum

Beispiel sehr aggressive Formen des Tumors den Somatostatin-Rezeptor nicht (Nock et al., 2005). In nicht-medullären Schilddrüsenkarzinomen und parathyroiden Karzinomen konnten keine CCK₂-Rezeptoren detektiert werden. Gleiches gilt für die nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome im Gegensatz zu den kleinzelligen. Somit ist eine Darstellung von CCK₂-Rezeptoren auch für die Unterscheidung verschiedener Tumortypen relevant (Reubi et al., 1997)

In Bezug auf das Kolonkarzinom findet die CCK₂-Rezeptor-Expression offensichtlich nicht in allen Karzinomen statt (Smith und Watson, 2000). So wurden von Reubi et al. (1997) keine Rezeptoren in den von ihnen untersuchten Kolonkarzinomen entdeckt. Matsushima entdeckte mRNA für CCK₂-Rezeptoren in einer von insgesamt 8 Kolonkarzinom-Zelllinien, in 2 von 10 untersuchten Gewebeproben von kolorektalen Karzinomen und gar keine in normaler Kolon-Schleimhaut (Matsushima et al., 1994). Hellmich et al. hingegen berichten von einer Splice-Variante des CCK₂-Rezeptors, dem CCK-BRi4sv-Rezeptor, in allen von ihnen untersuchten Gewebeproben von kolorektalen Karzinomen und in deren Vorstufen, den adenomatösen Polypen (Hellmich et al., 2000). Für verschiedene humane Kolonkarzinom-Zelllinien, wie z.B. HT29-Zellen, ist ebenfalls das Vorhandensein von CCK₂-Rezeptoren beschrieben worden.

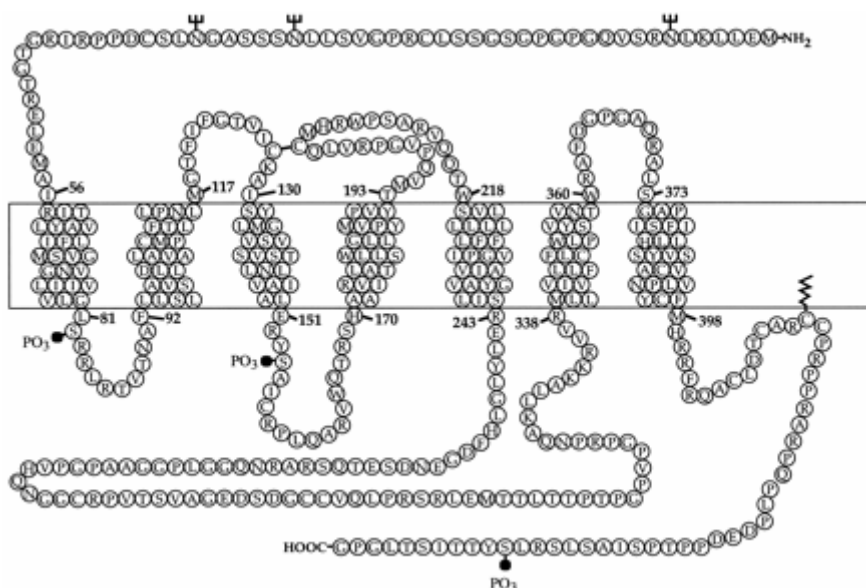


Abb. 3: Schematische Darstellung des Cholecystikinin₂-Rezeptors der Ratte: Der Rezeptor gehört zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten 7-Transmembranrezeptoren (Quelle: Noble et al., 1999).

Das an den CCK₂-Rezeptor bindende Gastrin ist ein Peptidhormon des Magen–Darm–Trakts. Es wird von den G-Zellen des Magens als Antwort auf Dehnungsreize, Anstieg des pH-Wertes, Alkohol, Koffein, Peptide aus der Proteinverdauung und Vagusreizung freigesetzt. Außerdem steuert es die Sekretion von Salzsäure und Pepsinogen, die Tonisierung des unteren Ösophagussphinkters, die Antrumperistaltik und die Pankreas- und Gallensekretion (Pschyrembel, 1997). Gastrinpeptide kommen als so genanntes big-Gastrin (34 Aminosäuren), Gastrin I und II (17 Aminosäuren), sowie als Minigastrin (13 Aminosäuren) vor (Löffler und Petrides, 1997). Die minimale notwendige Sequenz von Gastrin und seinen Analoga für die Bindung an den CCK₂-Rezeptor ist das C-terminale Tetrapeptid Trp-Met-Asp-Phe (Tracy und Gregory, 1964).

Gastrin besitzt neben seiner Wirkung als regulatorisches Peptid–Hormon ebenfalls einen wachstumsfördernden Einfluss auf unverändertes und Tumorgewebe und hat somit eine entscheidende Rolle in Funktionsstörungen des Körpers, v.a. des Gastrointestinaltrakts (Jensen 2002). Es fördert beispielsweise das Wachstum der Magenschleimhaut. Chronische Hypergastrinämie z.B. bei Zollinger-Ellison-Syndrom resultiert vor allem in ECL-Zellhyperplasie und in deren Folge in karzinoiden Tumoren. Der Einfluss von Gastrin auf das Wachstum anderer maligner Tumore, wie zum Beispiel Bronchialkarzinome, Pheochromozytome, Ovarialkarzinome und kolorektale Karzinome, wurde vielseitig untersucht. Dabei fiel auf, dass Hypergastrinämie nicht zwangsläufig in der Ausbildung dieser Tumore resultierte. Dieses lässt auf eine autokrine oder parakrine Stimulation des Tumorwachstums durch Gastrin schließen. Bei der Untersuchung auf Gastrinsekretion der Tumoren fiel außerdem auf, dass alle Tumoren außer den Ovarialtumoren hauptsächlich Gastrinvorstufen wie z.B. Progastrin oder Gly-Gastrin produzieren (Jensen 2002, Dockray et al., 2001, Baldwin und Schulkes 1998) und darüber das Tumorwachstum via CCK₂-Rezeptor oder einen anderen Pro- und Gly-Gastrin bindenden Rezeptor beeinflussen. Vor allem für die Stimulation des Wachstums von Kolonkarzinomen durch diese Gastrinvorstufen wird ein Rezeptor verantwortlich gemacht, welcher nicht mit den CCK-Rezeptoren verwandt ist (Baldwin und Schulkes, 1998, Ahmed et al., 2004, Copps et al., 2007). Hellmich et al. (2000) hingegen führten das Tumorwachstum auf die von ihnen entdeckte Splicevariante des CCK₂-Rezeptors zurück und zeigten, dass das Wachstum Gastrin-unabhängig war.

Wie bereits erwähnt, wurde Gastrin schon in der szintigrafischen Bildgebung genutzt. So untersuchten Behr et al. (1999) verschiedene Cholecystokin- und Gastrinanaloga auf ihre Eignung zur Bildgebung CCK₂-Rezeptor – exprimierender Tumoren. Die Peptide wurden

zunächst an Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA), welche als Chelator fungiert, gekoppelt, und anschließend wegen mangelnder Stabilität der Radionuklide erst kurz vor der Untersuchung mit ^{111}In bzw. ^{131}I radioaktiv markiert. In den Untersuchungen der einzelnen Peptide zeichneten sich die Minigastrinderivate durch hohe Rezeptoraffinität und -selektivität, eine hohe Aufnahme in CCK_2 -Rezeptor exprimierenden Tumoren und Organen und einer zu Big-Gastrin vergleichsweise niedrigeren Anreicherung in der Niere aus. Trotz des für Peptide bekannten Abbaus durch Endo- und Exopeptidasen konnten Behr et al. (1999) bei ihren Stabilitätsuntersuchungen für die meisten von ihnen untersuchten Peptide Halbwertszeiten von einigen Stunden ermitteln. Sie berichten jedoch von einer Halbwertszeit von nur 45 min für L-Leu-Minigastrin im Gegensatz zu Minigastrin, bei welchem L-Leu mit dessen D-Isomer substituiert wurde (Halbwertszeit 8h).

Bei ihren klinischen Untersuchungen konnten Behr et al. (1999) mittels radioaktiv markiertem Minigastrin in vier untersuchten Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom das Karzinom und alle bekannten Metastasen darstellen. Es wurde sogar bei einem Patienten eine Lebermetastase detektiert, welche erst einen Monat später mittels Computertomografie bestätigt werden konnte. Die radioaktiv markierten Minigastrinderivate wurden von der Arbeitsgruppe in den folgenden Jahren weiterentwickelt (von Guggenberg et al., 2004, Nock et al., 2005). So wurden 3 verschiedene Minigastrinderivate, welche mittels unterschiedlicher Spacer an ^{99}Tc gekoppelt wurden, hergestellt und untersucht. Dabei gelang die Darstellung von Tumoren in Mäusen, welchen AR4-2J-Zellen (Pankreaskarzinom-Zellen der Ratte) implantiert wurden, sowie die Darstellung eines metastasierten medullären Schilddrüsenkarzinoms bei einem Patienten. Hiermit verbunden war jedoch die radioaktive Belastung des Patienten und eine mögliche Tumorinduktion, vor allem bedingt durch die Aufnahme und lange Verweilzeit des Radionuklids in der Niere (Behe et al., 2005).

Eine Detektion CCK_2R -exprimierender Tumoren durch optische molekulare Bildgebung mit Hilfe der Kopplung eines Fluorophors an Minigastrin und der Nutzung von NIR-Licht wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Zielsetzung

Die optische molekulare Bildgebung bietet in der Tumordiagnostik die aufgezeigten Vorteile wie schonende, nichtinvasive, frühzeitige und hochauflösende Darstellung. Daher soll in der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob es möglich ist, eine spezifische Sonde für CCK₂R-exprimierende Tumoren durch die Kopplung des Fluorophors DY-676 an Minigastrin herzustellen und damit die Tumoren mittels planarer Bildgebung mit einem Nahinfrarot-Fluoreszenz-Bildgebungsinstrument *in vivo* darzustellen.

Dabei soll nach folgender Strategie vorgegangen werden:

- Zunächst soll in Phantomversuchen der Fluoreszenzfarbstoff DY-676 in Verbindung mit dem planaren NIRF-Bildgebungsinstrument charakterisiert werden. Dabei soll mit Hilfe von Schweinefleisch- und Eigelbphantomen untersucht werden, wie sich die Erhöhung der DY-676-Konzentration bzw. eine Erhöhung der Belichtungszeit auf die mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument ermittelten Fluoreszenzintensitäten auswirkt. Auch der Einfluß des Zusammenfassens zweier vertikaler und horizontaler Pixel mit Hilfe der Einstellung des Binning Faktors 2 auf die Fluoreszenzintensität soll untersucht werden. Durch diese Charakterisierung des DY-676 soll die Einstellung der optimalen Geräteparameter für die spätere Darstellung von Tumoren mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument erleichtert werden.

- Anschließend soll überprüft werden, ob die Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffs DY-676 an Minigastrin möglich ist. Die so entstehende Sonde soll mittels HPLC aufgereinigt und das Dye/Protein-Verhältnis ermittelt werden. Dabei soll beachtet werden, wie hoch die Ausbeute des Verfahrens ist.

-
- Für die spätere *in vitro*- und *in vivo*-Anwendung der hergestellten Sonde und des NIRF-Bildgebungsinstruments soll ein geeignetes Zellmodell ermittelt werden. Dazu sollen humane Karzinomzellen mittels PCR-Analyse auf ihre CCK₂R-Expression untersucht werden. Dabei soll jeweils mindestens eine CCK₂R-positive und eine CCK₂R-negative Zelllinie ermittelt werden, welche als Negativ-Kontrolle für die folgenden Untersuchungen dienen kann. Anschließend soll in *in vitro*-Vorversuchen mit diesen Zellen geprüft werden, ob sich die CCK₂-Rezeptoren nach Inkubation mit der hergestellten Sonde mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument darstellen lassen. Dabei soll eine CCK₂R-positive Zelllinie ermittelt werden, welche eine für die *in vivo*-Versuche geeignete Fluoreszenzintensität mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument erreicht und deren Fluoreszenzintensität sich deutlich von der der CCK₂R-negativen Zelllinie unterscheidet. Anschließend durchgeführte etablierte Methoden wie FACS und CLSM sollen zur Evaluierung der mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument erzielten Ergebnisse genutzt werden.

 - Im Anschluss an die *in vitro*-Studien und Phantomversuche sollen die Tumorzellen der ermittelten Zelllinien in SCID-Mäuse implantiert werden. Nach i.v.-Injektion der hergestellten Sonde sollen die Fluoreszenzintensitäten der Tumoren mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument ermittelt werden und somit geprüft werden, ob eine Darstellung CCK₂R-exprimierender Tumoren *in vivo* möglich ist. Dabei soll vor allem untersucht werden, ob eine ausreichende Abgrenzung der Tumoren zu Nachbarstrukturen und zu CCK₂R-negativen Tumoren möglich ist. Um den Einfluß der Bioverteilung der Sonde im Organismus auf die Tumorbildgebung abschätzen zu können, soll im Anschluß an die *in vivo*-Untersuchungen eine NIRF-Bildgebung der entnommenen Mausorgane erfolgen.

3 Material

3.1 Substanzen

3.1.1 Der Nahinfrarotfarbstoff DY-676

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Nahinfrarotfluoreszenzfarbstoff ist das von der Firma DYOMICS neu entwickelte Fluorophor DY-676. Die wichtigsten Eigenschaften des Farbstoffs sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Strukturformel des Farbstoffs ist in Abb. 4 gezeigt.

Tab. 1: Eigenschaften des verwendeten Nahinfrarotfarbstoffs DY-676

Hersteller	DYOMICS, Jena, Deutschland
Absorptionsmaximum	674 nm
Emissionsmaximum	699 nm
Molekulargewicht	808,96 g/mol
Extinktionskoeffizient	90000 M ⁻¹ cm ⁻¹
Sonstige Eigenschaften	<ul style="list-style-type: none">- löslich in Wasser, Methanol, DMF, DMSO- geeignet für Protein-Labeling, FisH- Mikroskopie, Gel-Elektrophorese- negativ geladen

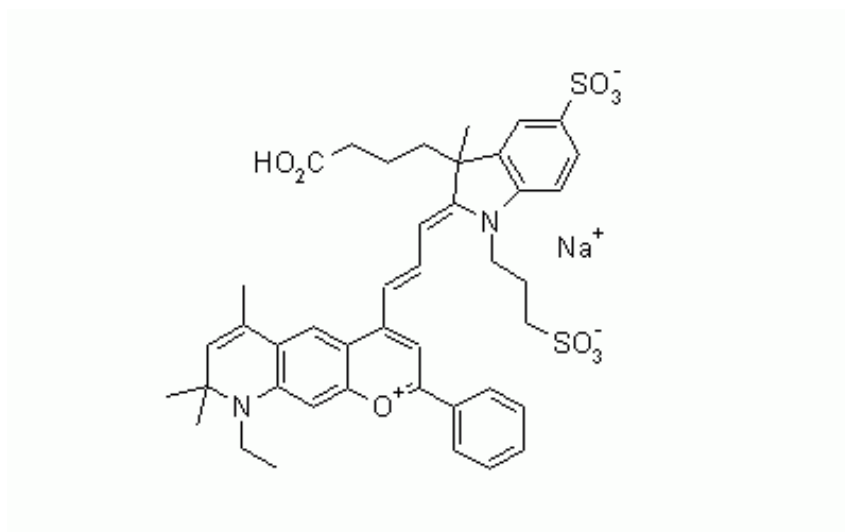


Abb.4: Strukturformel des Nah-Infrarot-Farbstoffes DY-676 (freie Säure)

3.1.2 Das Peptid Minigastrin

Das für die Herstellung der Sonde genutzte Peptid Minigastrin ist ein relativ kleines Gastrinderivat mit 13 Aminosäuren. Seine Aminosäurestruktur und das Molekulargewicht sind aus Tabelle 2 zu entnehmen.

Tab.2: Eigenschaften des verwendeten Peptids Minigastrin

Hersteller	BACHEM, Weil am Rhein, Deutschland
Struktur	H-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr(SO ₃ H)-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH ₂
Molekulargewicht	1742,8 g/mol
Reinheit	> 90%

3.1.3 Die verwendeten Zelllinien

Alle Zellen wurden über Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland, bezogen. In der vorliegenden Arbeit wurden A375-, LS174T- und HT29-Zellen verwendet. Für HT29-Zellen wurde CCK₂-Rezeptor-RNA durch Colucci et al. 2005 nachgewiesen. In Tabelle 3 sind die drei Zelllinien charakterisiert.

Tab.3: Eigenschaften der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	A375	LS174T	HT29
Herkunft	Human	Human	Human
Gewebe	malignes Melanom	kolorektales Adenokarzinom	kolorektales Adenokarzinom
Morphologie	Melanomzellen	Epithel	Epithel
Wachstum	adhärent	adhärent	adhärent
Kulturmedium	DMEM mit FKS	Earle's MEM mit FKS	DMEM mit FKS, Hepes

3.1.4 Sonstige Substanzen

In Tabelle 4 sind alle weiteren in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen mit ihrem Herstellernachweis aufgeführt.

Tab.4: Herstellernachweis der verwendeten Substanzen

Produkt	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Acetonitril (ACN)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bovine serum albumin (BSA)	Fluka-Chemie AG, Buchs, Schweiz
CCK ₂ R – Primer	Jena Bioscience GmbH, Jena, Deutschland
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenyl-indolx2HCl p.A.)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
DNA – Ladder	Geneo Bioproducts GmbH, Hamburg, Deutschland
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (25 mM Glucose, 1,0 mM Natriumpyruvat)	GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisely, Schottland
Eisessig	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisely, Schottland
Formaldehyd-Lösung	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
GAPDH – Primer	Jena Bioscience GmbH, Jena, Deutschland
Loading – Buffer	Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach, Deutschland
Matrigel™ Matrix	BD Biosciences, Bedford, MA USA
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
PCR - Mastermix	Geneo Bioproducts GmbH, Hamburg, Deutschland

Permafluor	Immunotech, Beckman Coulter Company, Marseille, Frankreich
Roti – Quick – Kit	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trifluoraceticacid (TFA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris-Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin/ EDTA 0,25% bzw. 0,02% in PBS	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Wasser für die Molekularbiologie, DEPC – behandelt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.2 Verbrauchsmaterial

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab.5: Herstellernachweis des Verbrauchsmaterials

Produkt	Hersteller
Alufolie	Papstar Vertriebsgesellschaft mbH & Co. KG Kall, Deutschland
Bechergläser	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Cell Scraper	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläser	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Einfrierröhrchen	Simport Plastics, Quebec, Kanada

Einmalspritze Injekt – H 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Einmal-Injektions-Kanüle	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Eppendorf-Cups	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Bedford, MA USA
Falcon-Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Glasflaschen	Schott GmbH, Jena, Deutschland
Glasmesspipetten Schellbach, Klasse A5, Hirschmann	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gewebekulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Objektträger Super Frost Color	Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG – Braunschweig, Deutschland
Pasteurpipetten	Assistent, Sondheim, Deutschland
PCR Tubes	Molecular Bio Products, San Diego, USA
Präzisionsküvetten aus Quarzglas	Hellma GmbH, Müllheim-Baden, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Reagenzgläser	Greiner Bio-One GmbH, Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Thoma-Zählkammer	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

3.3 Geräte

3.3.1 Das NIRF-Bildgebungsinstrument bonSAI

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete NIRF-Bildgebungsinstrument ist ein von Siemens Medical Solutions, Deutschland, für die Nah-Infrarot-*in vivo*-Bildgebung konzipierter biooptischer Kleintierscanner namens bonSAI (**b**io **o**ptical **n**earinfrared **S**mall **A**nimal **I**mager). Es handelt sich hierbei um ein planares Bildgebungssystem, welches Licht im Bereich der Wellenlänge von 450 nm bis 770 nm verwendet und entsprechende Fluoreszenzintensitäten detektieren kann. Es ist aufgebaut aus einer Probenkammer, in welche das Untersuchungsobjekt (z.B. Eppendorfcups mit Zellpellets, Maus) eingebracht wird, sowie einem Kopfteil, der die Lichtquelle, die verschiedenen Filter und die CCD-Kamera enthält. Außerdem erfolgt mit Hilfe eines daran angeschlossenen PCs die Bild- und Datenverarbeitung mittels der Software *syngo*. Vor der Lichtquelle befindet sich ein Filterradd mit welchem die Exzitationswellenlänge eingestellt wird. Mit Hilfe einer Glasfaseroptik wird das Licht dann in die Probenkammer geleitet. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch die CCD-Kamera aufgefangen, welcher ebenfalls ein entsprechender Filter vorgeschaltet wird (siehe Abb. 5 und 6). Der Benutzer des bonSAI kann für die Aufnahme verschiedene Parameter einstellen. So kann zwischen Binning Faktor (BF) 1 und 2 gewählt werden. Als Binning wird hierbei das Zusammenfassen mehrerer Pixel zu einem verstanden. Bei Binning Faktor 2 werden zwei horizontale und zwei vertikale Pixel zu einem zusammengefaßt. Dadurch wird eine hohe Empfindlichkeit der Pixel erreicht. Die Auflösung wird gleichzeitig herabgesetzt. Außerdem kann man eine automatische Korrektur anwenden, welche dafür sorgt, dass die gerätetechnisch bedingte inhomogene Ausleuchtung der Probenkammer rechnerisch ausgeglichen wird. Weitere Eigenschaften des Kleintierscanners sind Tabelle 6 zu entnehmen.

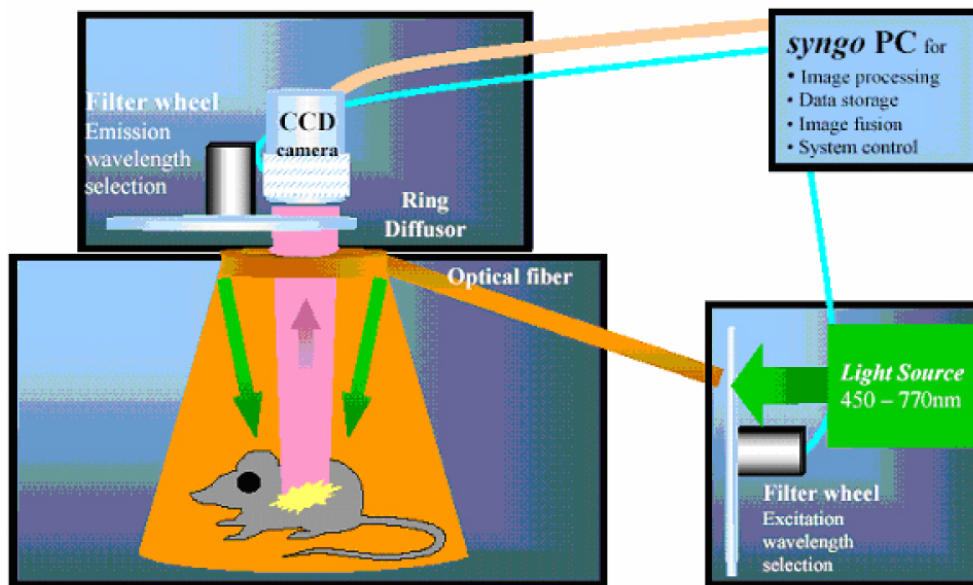


Abb.5: Schematische Darstellung des optischen Bildgebungsinstruments bonSAI. Bei dem für die Kleintierbildgebung konzipierten Fluoreszenzimager wird die zu messende Probe mit Licht bestimmter Wellenlänge angeregt, das emittierte Fluoreszenzlicht von einer CCD-Kamera detektiert und die gewonnenen Daten an einen PC weitergeleitet. (Quelle: Introduction to bonSAI™, Siemens medical solutions that help, Anke Siebert, PhD).



Abb.6: Das NIRF-Bildgebungsinstrument bonSAI mit linksstehender Probenkammer und darüber befindlichem Kopfteil, der Lichtquelle, CCD-Kamera und Filterräder enthält. Der angeschlossene PC (rechts) dient der Einstellung der verschiedenen Parameter (Wellenlänge, Binningfaktor, Belichtungszeit) und der Datenverarbeitung.

Tab. 6: Übersicht über die technischen Daten des biooptischen Klientierscanners bonSAI (SIEMENS)

Lichtquelle	150 mW Halogenlampe
Filter	447/527 nm (Abs./Em.) 527/610 nm 660/735 nm 662/800 nm Weißlicht
CCD- Kamera	Matrixgröße: 1360 (H) x 1024 (V) pixel Dynamic Range: 12 bit Belichtungszeit: 0,1 – 120 s Binning Faktor: BF1 (1360 x 1024 pixel; 4,6 x 4,6 µm per Pixel), BF2 (680 x 512pixel; 9,3 x 9,3 µm per Pixel)
Probenkammer	Homogen ausgeleuchtetes Feld: 12 cm ²

Die Bildaufnahmen des Bildgebungsinstruments bonSAI enthalten sogenannte Falschfarben, welche zur Interpretation der Fluoreszenz genutzt werden. Dabei entsprechen Farben im Blaubereich niedrigen Fluoreszenzintensitäten und Farben im Rotbereich hohen Intensitäten. Entstehen Fluoreszenzbilder, die ein weißes Signal liefern, so befindet man sich im Bereich der Detektionsgrenze des Gerätes. Die Ermittlung der Fluoreszenz eines bestimmten Bereichs erfolgt durch die Auswahl einer „Region Of Interest“ (ROI), welche das gewünschte Gebiet begrenzt. Dadurch kann der Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung der Fluoreszenzintensität in diesem Gebiet in beliebigen Einheiten (b.E.) bestimmt werden. Die Fluoreszenzintensität ist nicht nur vom verwendeten Fluorophor, sondern auch von der Streuung und Absorption des Lichts im Gewebe abhängig, wodurch eine absolute quantitative Auswertung nicht möglich ist. Demzufolge handelt es sich in der hier vorliegenden Arbeit stets um semiquantitative Auswertungen.

3.3.2 Sonstige Geräte

Die weiteren in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tab.7.: Herstellernachweis der verwendeten Geräte

Produkt	Hersteller
Auswertungsprogramm	Microsoft Excel 97
Brenner Vulcan	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Brutschrank	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Einfriergefäß	Qualilab, Bender & Hobein, USA
Eppendorfpipetten (20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage LA 230 P	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Flow-Cytometer FACS-Calibur	BD Biosciences, Bedford, MA USA
Fotobearbeitungsprogramm	Adobe Photoshop 7.0
HPLC Äktapurifizier	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Imagemaster VDS	Amersham Pharmacia Biotech, Freiberg, Deutschland
Magnetrührer	IKA Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop BX-50	Olympus, Hamburg, Deutschland
Nanodrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Photospektrometer (Ultrospec 4300 pro)	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden

Phasenkontrastmikroskop Olympus CK 40	Olympus, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Schweiz
Purelab Plus für aqua _{bidest.} (0,055 µS/cm)	USF, Ransbach-Baumbach, Deutschland
Reinraumwerkbank	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Stickstofftonne Chronos	Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland
Thermocycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tiefkühltruhe (-80°C)	Scientific Equipment Group GmbH, Egelsbach, Deutschland
Vacusafe	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Vortex	Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y. USA
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Laborgerätetechnik, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Biofuge primo	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

4 Methoden

4.1 Vorversuche mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument bonSAI

4.1.1 Phantomversuche mit Schweinefleisch

Lösungen: **DY-676** - 20 mM, gelöst in DMF
PBS - 0,1 M, pH 7,2

In Schweinefleischquader von 2 cm Kantenlänge und 1 cm Höhe wurden je 50 µl DY-676 in Konzentrationen von 0 bis 4 µM injiziert. Anschließend wurde zunächst ein Weißlicht-Bild bei Binning Faktor (BF) 1 und der Belichtungszeit (BZ) von 0,5 s mit dem biooptischen Kleintierscanner bonSAI angefertigt. Darauf folgten Nah-Infrarot-Aufnahmen bei Belichtungszeiten von 0,5 s bis 6 s mit dem Filter 660/735 bei BF 1 und 2. Die Einstellung des Filters 660/735 im optischen Kleintierscanner bonSAI ermöglicht die Anregung einer Probe mit einer Wellenlänge von 660 ± 15 nm ($\lambda_{\text{Excitation}}$) und die Detektion von Licht der Wellenlänge 735 ± 15 nm ($\lambda_{\text{Emission}}$). Dieser Filter wurde für alle in der Arbeit durchgeführten Untersuchungen im Nah-Infrarot-Bereich verwendet. Für die Konzentrationen 2 µM und 1 µM wurden je 6 Bestimmungen und für die Konzentration 4 µM und 0,5 µM je 3 Bestimmungen durchgeführt.

Die semiquantitative Auswertung erfolgte durch manuelle Auswahl einer „Region Of Interest“ (ROI) auf der Oberfläche der Quader von stets gleicher Größe. Mit Hilfe der Software *syngo* des Bildgebungsinstruments bonSAI konnte somit der Mittelwert der Fluoreszenzintensität mit zugehöriger Standardabweichung auf dieser Fläche in beliebigen Einheiten (b.E.) bestimmt werden.

4.1.2 Phantomversuche mit Eigelb

Lösungen:	DY-676	- siehe 4.1.1
	PBS	- siehe 4.1.1
	A. dest	
	2 Eigelb	

Um eine mögliche inhomogene Verteilung des DY-676 im Phantom auszuschließen, wurde Eigelb als zweites Modell verwendet. 2 Eigelb wurden mit ca. 5ml A. dest in einen Falcontube überführt und kräftig jedoch ohne Schaumbildung vermischt. Dann wurden 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit je 1ml Eigelb gefüllt. Es wurde eine Konzentrationsreihe des DY-676 (2 μ M, 1 μ M, 0,5 μ M, 0,2 μ M und 0 μ M) erstellt, 100 μ l der entsprechenden Konzentration zum Eigelb zugegeben und gemischt. Anschließend wurde das Eigelb für 5 min bei 80°C im Wasserbad denaturiert bis es fest wurde. Danach wurden die Reaktionsgefäße aufgeschnitten und das Eigelb herausgelöst, so dass ca. 0,5 cm hohe Eigelbscheiben entstanden, welche auf dem Probenblett des Bildgebungsinstruments bonSAI angeordnet wurden. Es wurde wieder zunächst ein Weißlicht-Bild angefertigt und anschließend Fluoreszenzaufnahmen bei Belichtungszeiten von 0,5 s bis 6 s mit dem Filter 660/735 und BF 1 und 2 erstellt. Dabei wurden für jede Konzentration drei Bestimmungen durchgeführt. Die semiquantitative Auswertung der Nahinfrarot-Aufnahmen erfolgte ROI-basiert (siehe 4.1.1).

4.2 Herstellung der spezifischen Sonde

4.2.1 Kopplung von DY-676 an Minigastrin

Lösungen:	Coupling - Buffer	- 50 mM NaHCO ₃ in A. bidest, pH 9,0
	DY-676-NHS-Ester	- 4,1 mM gelöst in Coupling Buffer
	Minigastrin	- 5 mg/ml Coupling Buffer

Die Kopplung von DY-676 an Minigastrin erfolgte anhand des Kopplungs-Protokolls von DYOMICS (Catalogue Fluorescent Dyes for Bioanalytical and Hightech Applications, 2005):

Es wurden 200 µl der Peptidlösung (entspricht 1 mg bzw. 0,6 µmol Minigastrin) mit 300 µl DY-676-NHS in Coupling Buffer (entspricht 1 mg bzw. 1,1 µmol DY-676-NHS) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur an einem dunklen Ort zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch im Kühlschrank bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

4.2.2 Aufreinigung der Sonde mittels HPLC

Lösungen:	Reaktionsgemisch	-	aus 4.2.1
	Methanol	-	HPLC-Grade
	Acetonitril	-	HPLC-Grade
	TFA		
	A. bidest		
	HPLC-Lösung A	-	0,1% TFA (v/v) in A. bidest
	HPLC-Lösung B	-	80% ACN (v/v), 0,1% TFA (v/v) in A. bidest

Das an DY-676-NHS-Ester gekoppelte Peptid wurde mittels HPLC aufgereinigt, um es vom ungekoppelten Peptid zu trennen. Die Trennung erfolgte mit dem System Äktapurifier von Amersham Biosciences und der Säule LiChroCART® 250-4 von Merck.

Mit einer Waschlösung A und B (mobile Phase) wurde in der HPLC-Säule (stationäre Phase) ein Konzentrationsgradient über 40 min mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgebaut und das Reaktionsgemisch (siehe 4.2.1) automatisch auf die Säule aufgebracht. Die am Ende der Säule in Abhängigkeit von der Retentionszeit erscheinenden Substanzen wurden anhand von Absorptionsmessungen (bei 280 nm für Minigastrin und bei 670 nm für DY-676) identifiziert. Als Waschlösung B wurde Methanol, Acetonitril bzw. 80%ige Acetonitril-Lösung in A. bidest mit 0,1%TFA genutzt. Waschlösung A stellte A. bidest bzw. 0,1%ige TFA in A. bidest dar. Bei den Versuchen der HPLC mit reinem Methanol oder Acetonitril als Lösung B konnte keine genügende Elution der Sonde erreicht werden,

daher wurden die 80%ige Acetonitril-Lösung in A. bidest mit 0,1%TFA als Lösung B und 0,1%ige TFA in A. bidest als Lösung A verwendet.

Insgesamt waren 5 HPLC-Durchläufe notwendig, um 500 µl des Reaktionsgemischs aufzureinigen. Bei jedem signifikanten Anstieg der Absorption, d.h. nach ca. 17 min bei 280 nm (ungekoppeltes Minigastrin) bzw. nach ca. 27 min bei 280 nm und 670 nm (gekoppeltes Minigastrin, drei Scheitelpunkte) wurde das Eluat aufgefangen.

Die Eluate zu den Scheitelpunkten des gekoppelten Peptids wurden getrennt aufgefangen. Da die zuerst eluierte im Gegensatz zu den weiteren Fraktionen mehr Protein enthielt (siehe 5.2, Abb. 12), wurde diese als Sonde für die folgenden Versuche genutzt und als Mini-DY bezeichnet. Das Eluat, welches bei einem Anstieg der Fluoreszenz bei ausschließlich 280 nm aufgefangen wurde (ungekoppeltes Peptid), wurde verworfen.

Die HPLC-Produkte wurden fraktionsweise bei -80°C gelagert und anschließend bei -50°C gefriergetrocknet bzw. per Vakuumzentrifuge eingeengt. Daraufhin wurde jede Peptidfraktion in 500µl A. dest gelöst und die Peptidkonzentration bestimmt. Die anschließende Lagerung erfolgte in Aliquots bei -20°C.

4.2.3 Bestimmung der Peptidkonzentration

Lösungen: *Mini-DY* - siehe 4.2.2
A. dest

Die Bestimmung der Peptidkonzentration erfolgte durch Absorptionsmessverfahren am Photospektrometer (Ultrospec 4300 pro) nach Warburg und Christian (1941). Dabei wurden für jede Probe 1:20-, 1:50- und 1:100-Verdünnungen in A. dest hergestellt und das jeweilige Absorptionsspektrum gegen die Referenz Wasser ermittelt.

Die Auswertung der Absorptionsspektren erfolgte mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes $E_{\lambda} = c * \epsilon_{\lambda} * d$, wobei E_{λ} die gemessene Extinktion, c die gesuchte Konzentration, ϵ_{λ} den Extinktionskoeffizienten und d die Schichtdicke der Quarzküvette (1cm) darstellt.

Da mittels HPLC-Daten und aufgrund thermodynamischer Überlegungen ein DY-Protein-Verhältnis von 1 angenommen werden konnte (siehe 5.2, Abb.12 bzw. 6.2), wurde nur die Konzentration für DY-676 mittels der gemessenen Extinktion bei 665 nm ermittelt und die gleiche Konzentration für Minigastrin angenommen. Der Extinktionskoeffizient von DY-676 beträgt $90000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Wert in der eigenen Arbeitsgruppe bestimmt).

4.3 *in vitro* – Zellversuche

Für die Zellversuche wurden HT29-, LS174T- und A375-Zellen genutzt. Eine genaue Beschreibung der Zellen ist 3.1.3 zu entnehmen. Die HT29- und LS174T-Zellen sind CCK₂R-positive und die A375-Zellen CCK₂R-negative Zellen (Negativkontrolle) (siehe 5.3).

4.3.1 Zellkultur

Lösungen: Kulturmedium	- DMEM (für A375- und HT29-Zellen) bzw. Earle 's MEM (für LS174T) mit 10% (V/V) FKS für HT29-Zellen zusätzlich 1% Hepes
PBS	- 0,1 M, pH 7,2
Trypsin/ EDTA-Lösung	- 0,1 M, pH 7,2
Trypanblau-Stammlösung	- 400 mg Trypanblau in 100 ml 0,1 M PBS (filtriert)
Einfriermedium	- Kulturmedium mit 8% DMSO

Die Zellen jeder Zelllinie wurden bei 37°C und 5% CO₂ Luftfeuchtigkeit (Standardkulturbedingungen) in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 160 cm² kultiviert. Das Arbeiten mit den Zellen erfolgte grundsätzlich unter sterilen Bedingungen an der Reinraumwerkbank.

Zum Kultivieren der Zellen wurden 10⁷ eingefrorene Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in eine mit 30 ml Medium vorbereitete Zellkulturflasche überführt. Da das im Einfriermedium enthaltene DMSO toxisch ist, wurde am folgenden Tag das Medium erneuert.

Nach Erreichen von etwa 80% Konfluenz der Zellpopulation, wurden die Zellen passagiert. Nach Absaugen des alten Mediums, wurde dreimal mit raumtemperiertem PBS

gewaschen, anschließend 3 ml Trypsin auf den Zellrasen gegeben und die Kulturflasche für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde Medium zugegeben und die Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt, in ein Falcontube überführt und 3 Minuten bei 200 x g sedimentiert. Zuvor wurden 100 µl Suspension zur Zellzählung entnommen und mit 900 µl der Trypanblau–Stammlösung in einem Reaktionsgefäß vermischt. Etwa 10 µl dieser Lösung wurden in zwei Thomakammern pipettiert. Die sich in den beiden Kammern befindenden Zellen wurden unter dem Mikroskop ausgezählt. Mit der folgenden Formel wurde die Gesamtzellzahl in dem vorhandenen Suspensionsvolumen errechnet.

$$\frac{\bar{x} * V_S * a}{V_T} = \frac{\bar{x} * 1000 \mu l * 10}{0,064 \mu l} = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

- \bar{x} Quersumme der beiden ermittelten Zellzahlen
- V_S Volumen der Messsuspension (1000 µl)
(900 µl Trypanblaulösung + 100 µl Zellsuspension)
- a Verdünnungsfaktor
- V_T Volumen der Thomakammer über dem Zählraster

Die ermittelte Zellzahl wurde anschließend mit dem Volumen multipliziert, welches beim Passagieren in den Falcontube aufgenommen wurde.

Nach dem Zentrifugieren wurde der Trypsin-enthaltende Überstand abgesaugt, die Zellen mit frischem Medium resuspendiert, auf eine Zellzahl von 5×10^6 Zellen eingestellt und auf eine vorbereitete neue Kulturflasche ausgesät. Das Zellwachstum wurde täglich unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Mediumwechsel erfolgte im Abstand von drei Tagen und Passagieren je nach Konfluenz nach ca. 7 Tagen.

Zur Kryokonservierung wurden 10^7 Zellen in 1 ml Einfriemedium suspendiert, in Einfriergefäße überführt und 15 min bei 4°C in einem mit Isopropanol gefüllten Gefäß gekühlt. Anschließend wurden die Zellen zwei Tage bei -80°C und danach bei -196°C eingefroren.

4.3.2 PCR – Analyse

Von LS174T-, A375- und HT29-Zellen (siehe 3.1.3) wurden Zellpellets à 10^7 Zellen bei -80°C eingefroren, um später eine RNA-Isolierung mit anschließender PCR durchzuführen.

4.3.2.1 RNA – Isolierung

Lösungen: **DEPC–Wasser**

Roti–Quick - Kit

Ethanol

- 70% (v/v) in DEPC - Wasser

Die RNA-Isolierung erfolgte anhand des Protokolls des Roti-Quick-Kits der Firma Carl Roth. Dafür wurden die eingefrorenen Zellpellets nach Zugabe von 600 µl Roti-Quick 1 aufgetaut, gut resuspendiert und durch das in der Roti-Quick 1-Lösung enthaltene Guanidinthiocyanat lysiert. Im Anschluss wurde diese Lösung sorgfältig mit 800 µl Roti-Quick 2 (Phenol- und Chloroform-haltig) vermischt und der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert. Nach Sedimentieren des Ansatzes für 15 Minuten mit 9725g bei 4°C, wurde die obere wässrige Phase entnommen und 700 µl Roti-Quick 3 (Isopropanol-haltig) zur Fällung der RNA zugegeben. Diese Suspension wurde 40 Minuten bei -20°C inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 9725g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und jedes RNA-Pellet in 600 µl Roti-Quick 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 600 µl Roti-Quick 3 wurde die Suspension erneut für 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA bei 13000 rpm und 4°C für 15min sedimentiert und dann zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Mittels Vakuumzentrifuge wurde die Probe getrocknet und daraufhin in 40µl DEPC–Wasser aufgenommen. Menge und Konzentration der isolierten RNA wurden anschließend mittels Spektralphotometer (Nanodrop) bestimmt.

4.3.2.2 Reverse Transkription

Lösungen: **DEPC – Wasser**

Oligo (dT)₁₆

dNTPs

- 10 mM

5x Bioscript Buffer

- Fertigprodukt, keine Angabe vom Hersteller

<i>RNase – Inhibitor</i>	- 200 U/ μ l
<i>Reverse Transkriptase</i> <i>(BioScript)</i>	- 200 U/ μ l

Nach dem Protokoll des cDNA Synthesis Kits (Bioline) wurden die Proben wie in Tabelle 8 aufgezeigt in Reaktionsgefäßen für PCR vorbereitet:

Tab.8: Probenvorbereitung für die Reverse Transkription nach dem Protokoll von Bioline

RNA	1 μ g
Oligo(dT) ₁₆	1 μ l
dNTPs	1 μ l
DEPC-H ₂ O	je nach RNA-Menge auf 10 μ l aufzufüllen

Die Proben wurden im Thermocycler für 10 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt. Daraufhin wurde für jede Zelllinie ein Reaktionsmix (siehe Tabelle 9) hinzupipettiert.

Tab.9: Reaktionsmix für die Transkription der isolierten RNA in cDNA nach dem Protokoll von Bioline

5xBioscript Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l
BioScript (200U/ μ l)	0,25 μ l
DEPC-H ₂ O	4,75 μ l

Anschließend wurden die Proben im Thermocycler 50min bei 45°C sowie 15 min bei 70°C inkubiert und danach auf Eis gelagert. Menge und Konzentration der cDNA wurden mittels Spektralphotometer (Nanaodrop) bestimmt.

4.3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Lösungen: **DEPC–Wasser**

2xPCR Mastermix

- Taq DNA–Polymerase
0,1 u/μl, Antikörper für Taq–Polymerase, (NH₄)₂SO₄ 32 mM, TrisHCl, 130 mM, pH 8,8, Tween–20, 0,02% (v/v), MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,4 mM

Starteroligonukleotide

- je 10 μM in DEPC–Wasser

Die Probenherstellung zur PCR–Analyse erfolgte nach dem Protokoll des PCR–Kits der Firma Geneo BioProducts (Mastermix siehe Tabelle 10). Die Starteroligonukleotide (Primer) für den Nachweis der CCK₂–Rezeptor–Sequenz wurden nach dem Protokoll von Colucci et al. (2005) ausgewählt (siehe Tabelle 11).

Tab.10: Mastermix nach dem Protokoll von Geneo BioProducts

cDNA	1 μg
2xPCR – Mastermix	12,5 μl
CCK ₂ bzw. GAPDH– Forward Primer CCK ₂ bzw. GAPDH– Reverse Primer	1,25 μl CCK II–Primer (5 μM Endkonzentration) bzw. 0,25 μl GAPDH (1 μM Endkonzentration)
DEPC – Wasser	je nach cDNA – Menge auf 25 μl aufzufüllen

Es wurde je Zelllinie ein Ansatz mit Primern für die Sequenz der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als interner Standard (Haushaltsgen) und ein Ansatz mit Primern zum Nachweis der CCK₂R–Sequenz hergestellt. Außerdem wurde für beide Primer eine Probe mitgeführt, die statt cDNA Wasser enthielt.

Tab.11: Parameter der für die PCR verwendeten Primer

Gen	Anlagerungs-temperatur	Produkt	Sequenz
GAPDH	66°C	520 bp	5': TCG GAG TCA ACG GAT TTG GTC GTA 3': ATG GAC TGT GGT CAT GAG TCC TTC
CCK ₂	68°C	562 bp	5': GTA CGG GCT TAT CTC TCG CGA GCT CT 3': GGA AGA GCC CTG GGG CGA GCT CGT GG

Für die PCR wurden im Thermocycler folgende Parameter gewählt:

Für GAPDH:

- | | | |
|---------------|------------------------------|-------------|
| 1) 94°C 3 min | Denaturierung der DNA | |
| 2) 94°C 30 s | Denaturierung der DNA | |
| 3) 66°C 30 s | Primerhybridisierung | } 25 Zyklen |
| 4) 72°C 30 s | Elongation | |
| 5) 72°C 5 min | Deaktivierung der Polymerase | |
| 6) 4°C | Abkühlen | |

Für die PCR zum Nachweise der CCK₂R-Sequenz wurde das gleiche Programm wie für GAPDH genutzt, jedoch wurden für die Primerhybridisierung eine Temperatur von 68°C und die Anzahl von 40 Zyklen statt 25 Zyklen gewählt. Anschließend wurden die Proben bei -20°C eingefroren bzw. zur Agarosegelelektrophorese weiter verwendet.

4.3.2.4 Agarosegelelektrophorese

- | | | |
|-----------|----------------------------------|---|
| Lösungen: | Ethidiumbromid | - 2 mg/ml |
| | TAE –Elektrophoresepuffer | - 24,2 g Tris-Base , 5,71 ml
Eisessig und 100 ml 5 mM
EDTA in 1l H ₂ O, pH 8 |
| | Agarose | |
| | DNA – Leiter | - 0,25 µg/µl 100 bp–Ladder in
10 mM Tris-HCl (pH 7,6),
1 mM EDTA |
| | 6fach Loading-Buffer | - 0.09% Bromphenolblau,
0.09% Xylencyanol, 60%
Glycerol, 60 mM EDTA |

Es wurde ein 2%iges Agarosegel (2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer) gegossen, welches mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml Gel) versetzt wurde. Die PCR-Produkte wurden mit 5 µl Loading-Buffer versetzt und je 10 µl davon in die Geltaschen pipettiert. In die erste Tasche wurde die ebenfalls mit Loading-Buffer versetzte DNA-Leiter gegeben. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 100 V und einer maximalen Stromstärke von 200 mA für eine Stunde durchgeführt und die entstandenen Banden mit Hilfe des Geldokumentationssystems Imagemaster® VDS detektiert.

4.3.3 NIRF-Darstellung der Cholecystokinin₂-Rezeptor-Expression verschiedener Zelllinien nach Inkubation mit der Sonde

Zur Ermittlung der für die *in vivo*-Versuche geeigneten Zellen wurden die Zellen der einzelnen Zelllinien (A375-, LS174T und HT29-Zellen) mit Mini-DY inkubiert und im Bildgebungssystem bonSAI untersucht. Zur Kontrolle dieser neuen Methode wurde anschließend mittels Durchflußzytometrie (Fluorescence activated cell sorting–FACS) und CLS-Mikroskopie (Confocal Laser Scanning Microscopy) das erhaltene Ergebnis überprüft.

4.3.3.1 Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten der Zellen mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument bonSAI

- | | |
|------------------------------|---------------------------------|
| Lösungen: FACS-Puffer | - PBS pH 7,4; 2% BSA; 2 mM EDTA |
| Mini – DY | - siehe 4.2.2 |

Je 10^6 Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen, mit der Sonde versetzt und im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Sondenkonzentration und die Inkubationszeit wurden dabei variiert. So wurden Sondenkonzentrationen von 0,5, 1 und 2 µg/ 10^6 Zellen eingesetzt und Inkubationszeiten von 5, 30 und 60 min gewählt. Für jede Zelllinie wurde jeweils eine Probe ohne Sonde mitgeführt. Nach der Inkubation mit der Sonde wurde erneut zweimal mit FACS-Puffer

gewaschen, die Zellen in 1ml FACS-Puffer aufgenommen und die Suspension abzentrifugiert.

Anschließend wurden die 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit nach oben gerichteten Zellpellets auf ein Probenblett des biooptischen Kleintierscanners bonSAI gelegt und die Messung der Fluoreszenz bei BF 2 und dem Filter 660/735 bei Belichtungszeiten von 0,5 und 1 s durchgeführt (siehe Phantomversuche 4.1).

Zur Weiterverwendung für die FACS-Analyse wurden die für die Untersuchung mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI vorbereiteten Zellen in FACS-Röhrchen überführt.

4.3.3.2 FACS-Analyse

Bei der Durchflußzytometrie, auch FACS (Fluorescence activated cell sorting) genannt, werden Zellen einzeln durch eine Kapillare gesaugt und passieren dabei einen Laserstrahl. Dabei entsteht Streulicht, welches je nach Zellgröße, Wandstruktur, intrazellulären Bestandteilen und gebundenen Reportern variiert. Mit Hilfe des Auffangens von Vorwärtstreulicht FSC (*Forward Scatter*) als Maß für die Zellgröße und von Seitwärtstreulicht SSC (*Side Scatter*) als Maß für die Granularität, kann die Zelle charakterisiert werden. Durch den Laserstrahl kann ebenfalls ein an die Zelle gebundenes Fluorochrom zur Fluoreszenz angeregt werden. Dabei ist die emittierte Photonenkonzentration proportional zur Menge an Farbstoff pro Zelle und man erhält beim Einsatz von fluorochrommarkierten Antikörpern weitere Informationen über die Zelle, z.B. über die Expression von Oberflächenmolekülen. Im in der vorliegenden Arbeit verwendeten Durchflußzytometer FACSCalibur (BD Biosciences) passierten die Zellen einen Argonlaserstrahl (15 mW; 488 nm). Mit diesem System ist durch drei verschiedene Fluoreszenzkanäle (FL1 bis FL3) die gleichzeitige Analyse von bis zu drei Fluorochromen (FL1: 530/30 nm-Bandpassfilter; FL2: 585/42 nm-Bandpassfilter; FL3: 670 nm-Langpassfilter) möglich. Der in der Arbeit eingesetzte Farbstoff DY-676 wurde im Kanal FL3 detektiert.

Die dazugehörige Software CellQuest ermöglichte u.a. die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der analysierten Zellen in Form von Histogrammen, wobei außerdem die mittlere Fluoreszenzintensität aller gemessenen Ereignisse ermittelt werden konnte.

Für die FACS–Analysen der mit Sonde inkubierten Zellen wurden die Proben wie unter 4.3.3.1 beschrieben hergestellt.

4.3.3.3 CLS–Mikroskopie

Lösungen: <i>PBS</i>	- siehe 4.3.1.2
<i>PBS/BSA</i>	- PBS mit 2% BSA
<i>DAPI-Lösung</i>	- 5 µg/ml in EtOH
<i>Permafluor</i>	
<i>FACS-Puffer</i>	- siehe 4.3.3.1

Die in der FACS-Analyse verwendeten Zellproben wurden 1:10 in FACS-Puffer verdünnt, auf Objektträger aufgebracht und über Nacht bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Präparate bei –80°C eingefroren. Zur Vorbereitung für die CLS-Mikroskopie wurden die Objektträger mit PBS/BSA gewaschen und anschließend die Zellen für 1 h mit einer 1:50 Verdünnung der DAPI-Lösung in PBS/BSA bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Objektträger nochmals mit PBS gewaschen und anschließend mittels Permafluor und Deckgläschen abgedeckt.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit dem CLS–Mikroskop LSM510 (Zeiss). Dabei wurde ein Filter für die Darstellung der DAPI-Kernfärbung und ein LP-Filter (>650nm) für die Darstellung der Fluoreszenz genutzt. Die Auswertung der gewonnenen Bilder erfolgte mit der Software *LSM510 Image Examiner* (Zeiss).

4.4 NIRF-Bildgebung von CCK₂-Rezeptor exprimierenden Tumoren *in vivo*

4.4.1 Die verwendeten Versuchstiere

Für die *in vivo*-Versuche wurden SCID-Mäuse (SCID = *severe combined immuno-deficiency*) verwendet. Da diese Mäuse durch einen Mangel an Adenosindeaminase keine T- und B-Zellen entwickeln können, werden implantierte humane Tumorzellen von den Tieren nicht abgestoßen, sondern wachsen als Tumor an. In den Versuchen wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet (n=15). Zum Zeitpunkt der Versuche waren sie zwischen 6 und 15 Wochen alt und zwischen 20 und 30 g schwer. Die Tiere wurden vom Institut für Versuchstierkunde des FZL Jena zur Verfügung gestellt.

Alle Manipulationen an den Versuchstieren wurden nur durch dafür qualifizierte Personen vorgenommen. Alle Tierversuche waren vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz genehmigt (Reg.-Nr. 02-41/05).

4.4.2 Implantation der Tumorzellen in SCID-Mäuse

Lösungen: **Kulturmedium** - siehe 4.3.1.1

Matrigel

Trypsin/EDTA - siehe 4.3.1.2

PBS - siehe 4.3.1.2

Aufgrund der starken Agglomeration der LS174T-Zellen und einem in Vorversuchen aufgefallenem sehr schnellen Tumor-Wachstums nach Implantation der Zellen mit Nekrotisieren des Tumors wurden für die *in vivo*-Versuche HT29- und A375-Zellen ausgewählt. Es wurden 10 SCID-Mäusen HT29-Zellen und 5 SCID-Mäusen A375-Zellen subkutan implantiert. Dafür wurden 3×10^6 HT29-Zellen bzw. 1×10^7 A375-Zellen in 300 µl eisgekühltem Matrigel suspendiert und auf eine 1 ml-Injektionsspritze aufgezogen. Die Suspension wurde der Maus subkutan in den Bereich über der linken Brust injiziert. Die Mäuse wurden täglich auf Tumorgröße, Gewichtsverlust, Veränderungen des Fells und Inkontinenz kontrolliert. Das Anwachsen der Tumoren auf eine Größe von 0,5 cm

Durchmesser dauerte durchschnittlich 7-10 Tage. Da die HT29-Zellen ein sehr schnelles Tumorwachstum aufwiesen wurden weniger HT29-Zellen als A375-Zellen implantiert.

Etwa zwei Tage nach Implantation der Tumorzellen wurden die SCID-Mäuse unter Isoflurannarkose (O₂-Gemisch mit 2% Isofluran per inhalationem) im Brustbereich und an beiden Hinterbeinen rasiert, um bei der späteren Messung im optischen Kleintierscanner bonSAI Lichtreflexionen durch das Fell zu vermeiden.

Die Tiere erhielten ab dem Tag der Tumorimplantation Wasser *ad libitum* und eine spezielle pheophorbidarme Diät (Altromin, Lage, Deutschland) zur Verringerung der Autofluoreszenz.

4.4.3 Messung der Fluoreszenzintensitäten der Tumoren und Organe mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument bonSAI

Lösungen: <i>Mini-DY</i>	- siehe 4.2.2
<i>Minigastrin</i>	- 10 µg/µl in PBS
<i>PBS</i>	- siehe 4.3.1.2
<i>Isofluranas</i>	- 2% in O ₂
<i>Tissue-Tek</i>	
<i>Formaldehyd – Lösung</i>	- 5% (v/v) in Phosphatpuffer (46 mM Na ₂ HPO ₄ in A. dest)
<i>Flüssigstickstoff</i>	

Es wurden je 5 Tiere mit A375- bzw. HT29-Tumor nach Applikation von Mini-DY im Bildgebungsinstrument bonSAI vermessen. Zur Untersuchung auf spezifische Bindung der Sonde wurden zusätzlich 5 Tiere mit HT29-Tumor nach gleichzeitiger Applikation von 10 µg Mini-DY und 100 µg ungekoppelten Minigastrin mit dem Kleintierscanner bonSAI untersucht. Durch die gleichzeitige Injektion von Minigastrin sollten die CCK₂-Rezeptoren kompetitiv besetzt, d.h. eine so genannte Blockung durchgeführt werden. Je drei Tiere aus jeder Gruppe wurden nach 8 h und je 2 Tiere nach 24 h getötet.

Bei einer Tumorgöße von etwa 0,5 cm Durchmesser wurden die *in vivo*-Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurden die SCID-Mäuse unter Isoflurannarkose auf der

Einschubplatte des Bildgebungsinstruments bonSAI an den 4 ausgestreckten Gliedmaßen rücklings mit zentral ausgerichtetem Brustbereich fixiert. Anschließend erfolgten die Aufnahmen der Versuchstiere zunächst ohne Kontrastmittelgabe bei Weißlicht, bei BF 1 und einer BZ von 0,5 s sowie mit dem Filter 660/735 bei BF 1 und 2 und Belichtungszeiten von 0,5 s bis 6 s. Danach wurden 10 µg Mini-DY in 200 µl PBS bzw. 10 µg MinDY + 100 µg Mingastrin (Blockungsexperimente) in 200 µl PBS in die Schwanzvene appliziert und die Aufnahmen mit gleichen Einstellungen wiederholt. Es wurde 30, 60, 90, 120, 240, 360, 480 und zum Teil 1440 min nach Kontrastmittelgabe erneut gemessen. Danach wurden die Versuchstiere getötet und die Organe Leber, Niere, Milz, Herz, Magen und Lunge sowie der Tumor herauspräpariert. Die Fluoreszenz von Tumor und Organen wurde im Bildgebungsinstrument bonSAI bei Belichtungszeiten von 3 und 6 s bei BF 2 und Einstellung des Filters 660/735 ermittelt. Anschließend wurden die Organe in 1 ml Formaldehyd-Lösung fixiert bzw. in Tissue Tek eingebettet und mittels Flüssigstickstoff eingefroren. Um die Organfluoreszenzen mit den nativen Organfluoreszenzen vergleichen zu können, wurde die Fluoreszenz der Organe von 3 gesunden Mäusen ohne vorherige Gabe der Sonde im Bildgebungsinstrument bonSAI ermittelt. Die verschiedenen Versuchstiergruppen und die jeweilige Zusammensetzung der applizierten Sonde sind in Tabelle 12 gezeigt.

Tab.12: Versuchstiergruppen für die *in vivo*-Untersuchungen mit jeweiligem Tumor und der Zusammensetzung der applizierten Sonde (Mini-DY: an DY-676 gekoppeltes Minigastrin)

Gruppe	1	2	3
Tumor	HT29 – Tumor (CCK ₂ R – positiv)	HT29 – Tumor (CCK ₂ R – positiv)	A375 – Tumor (CCK ₂ R – negativ)
Anzahl der Tiere	5	5	5
applizierte Sonde	10 µg Mini-DY in 200 µl PBS	10 µg Mini-DY und 100µg Minigastrin in 200µl PBS	10 µg Mini-DY in 200µl PBS
Abtötung	3 Tiere nach 480min, 2 Tiere nach 1440min	3 Tiere nach 480min, 2 Tiere nach 1440min	3 Tiere nach 480min, 2 Tiere nach 1440min

Die Auswertung der NIRF-Aufnahmen erfolgte anhand manueller Auswahl kreisförmiger ROIs in der Tumorregion und beiden Hinterbeinen. Dadurch wurden die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten ermittelt (siehe Phantomversuche 4.1). Um eine unterschiedliche Beeinflussung der Fluoreszenzintensität der Hinterbeine durch Fluoreszenzsignale aus dem

Gastrointestinaltrakt auszuschließen, wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten beider Hinterbeine ermittelt und als Referenz (Muskelgewebe) genutzt. Um außerdem auszuschließen, dass die Tumorfluoreszenzen durch unterschiedliche Sondenmengen im Organismus der SCID-Mäuse beeinflusst werden, wie sie durch Schwierigkeiten bei der Schwanzveneninjektion (z.B. durch schließende Venenklappen) auftreten, wurde die relative Fluoreszenzintensität des Tumors ins Verhältnis zum Muskelgewebe gesetzt und dadurch sogenannte Tumor/Muskel-Verhältnisse berechnet, welche in den einzelnen Gruppen verglichen werden konnten.

4.5 Statistische Auswertung der semiquantitativen Fluoreszenzintensitäten

Die mit Hilfe des Bildgebungsinstrument bonSAI ermittelten semiquantitativen Fluoreszenzintensitäten sind, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt.

Die Prüfung der vorliegenden Daten auf statistische Signifikanz erfolgte mittels zweiseitigem Student's t-Test für unabhängige Stichproben. Für die Berechnung wurde das Students's t-Test-Programm der Universität Münster (Lewis et al., 1997) eingesetzt. Als statistisch signifikant wurde, soweit nicht anders angegeben, $p < 0,05$ angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Vorversuche mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument bonSAI

5.1.1 Phantomversuche mit Schweinefleisch

Bei den Phantomversuchen mit Schweinefleisch wurde ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität mit steigender DY-676-Konzentration verzeichnet, wie in Abb. 7b) und c) erkennbar ist. Bei BF 2 wurde für die gezeigten Konzentrationen zum Teil bereits die Detektionsgrenze des Bildgebungsinstruments bonSAI erreicht bzw. überschritten (weißes Falschfarbenbild, ca. 4096 b.E.). In beiden Aufnahmen wird zudem die inhomogene Verteilung des DY-676 im Schweinefleisch deutlich.

In Abb. 7 b) ist beispielhaft eine Region of Interest (ROI) dargestellt.

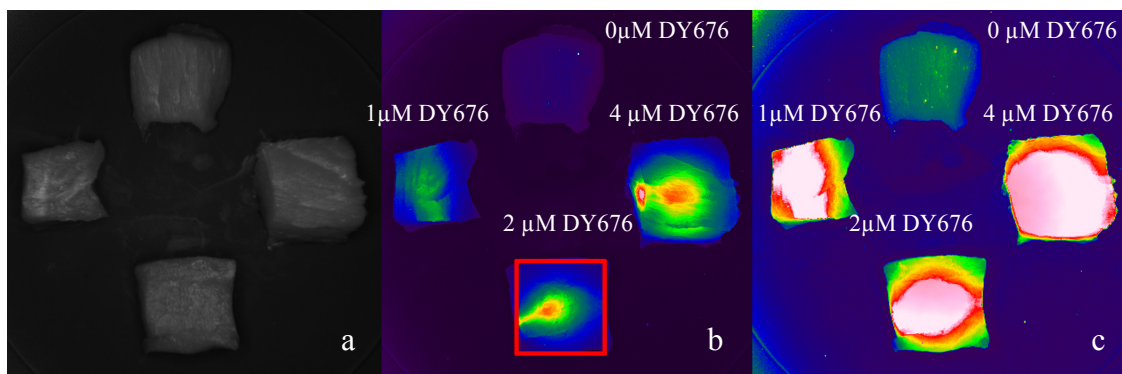


Abb. 7: Repräsentative makroskopische Weißlicht- und NIRF-Aufnahmen von Schweinefleischphantomen mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI

a) Weißlichtaufnahme (BF 1; BZ = 0,5 s); b) NIRF-Aufnahme bei BF 1 (660/735 nm; BZ=3,0 s); c) NIRF-Aufnahme bei BF 2 (660/735 nm; BZ=3,0 s). In die Schweinefleischquader (2 cm x 2 cm x 1 cm) wurden zuvor je 50 μ l PBS mit DY-676-Konzentrationen von 0 μ M – 4 μ M injiziert. Die rote Markierung in Abb. b) beschreibt eine Region of Interest (ROI). Durchführung der Versuche in Dreifachbestimmung

Bei BF1 nahm für alle DY676-Konzentrationen die Fluoreszenzintensität nahezu proportional zum Anstieg der Belichtungszeit zu (siehe Abb. 8 a). Bei BF2 wurde für hohe DY-676-Konzentrationen das durch das Gerät bedingte Detektions-Maximum von 4096 b.E. schon bei kurzen Belichtungszeiten erreicht, während sich die Fluoreszenzstärke der Schweinefleischphantome mit niedrigeren DY-676-Konzentrationen mit steigender Belichtungszeit langsam an das Maximum annäherte (siehe Abb. 8 b).

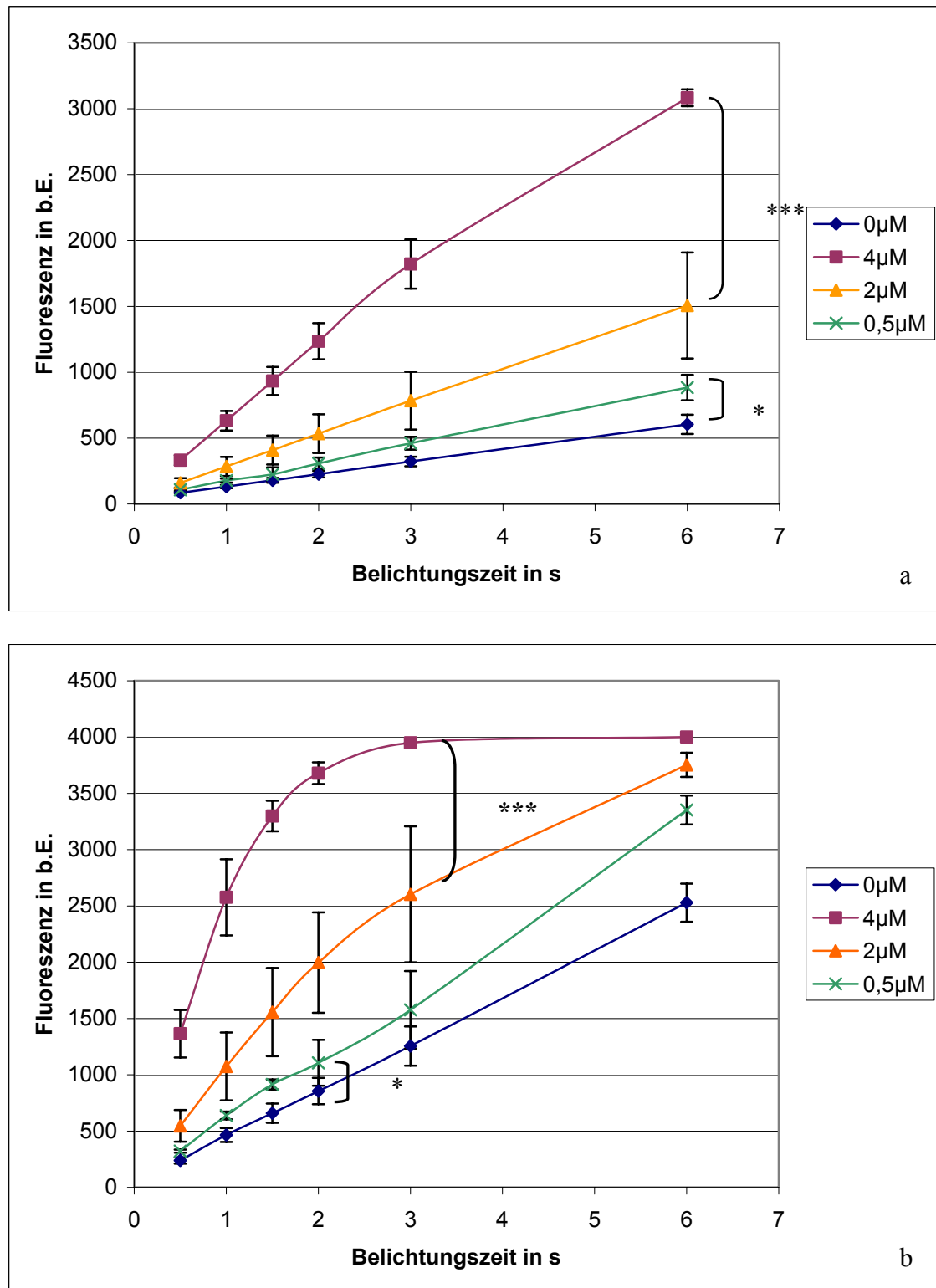


Abb. 8: Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Belichtungszeit ermittelten Fluoreszenzintensitäten der Schweinefleischphantome (ROI-basiert).

a) Mittelwerte und Standardabweichungen der Messungen bei BF 1; b) Mittelwerte und Standardabweichungen bei BF 2. In Schweinefleischquader (2 cm x 2 cm x 1 cm) wurden je 50 μ l PBS mit DY-676-Konzentrationen von 0 μ M – 4 μ M injiziert und anschließend die Fluoreszenzintensitäten mit dem Bildgebungssystem bonSAI ermittelt (660/735 nm, BZ 0,5 bis 6 s). Die Versuche wurden für 0 und 4 μ M DY-676 in Dreifachbestimmung und für 0,5 bis 2 μ M DY-676 6-fach durchgeführt. * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$

Die statistische Auswertung der semiquantitativ bestimmten Fluoreszenzintensitäten anhand eines zweiseitigen Student's t-Test ergab für BF 1 schon ab einer Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ DY-676 signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) gegenüber der Fluoreszenz von Schweinefleisch ohne DY-676 für Belichtungszeiten kürzer als 1,5 s bzw. länger als 2 s. Für BF 2 galt das Gleiche bei Belichtungszeiten bis 1,5 s. Im Vergleich von $2 \mu\text{M}$ zu $4 \mu\text{M}$ DY-676 wurden für BF1 für alle Belichtungszeiten und für BF 2 bis zu einer Belichtungszeit von 2 s signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) ermittelt.

5.1.2 Phantomversuche mit Eigelb

Auch bei den Phantomversuchen mit Eigelb war eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität mit steigender DY-676-Konzentration erkennbar, sowie eine homogenere Verteilung des DY-676-Farbstoffes im Eigelb im Vergleich zu der im Schweinefleisch (siehe Abb. 9).

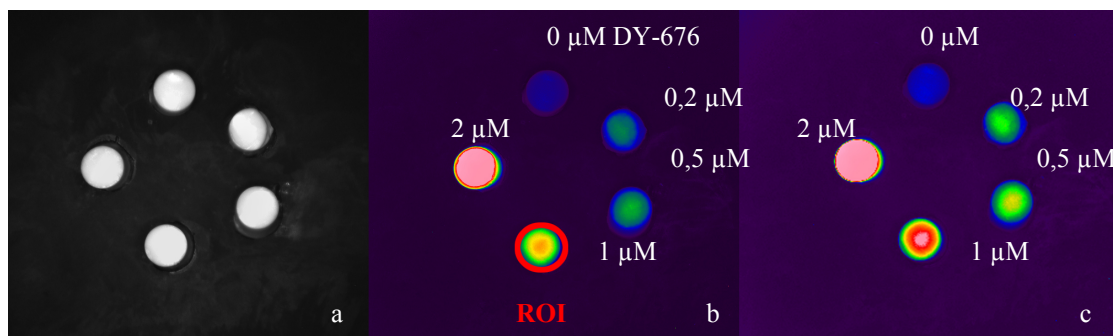


Abb. 9: Repräsentative makroskopische Weißlicht- und NIRF-Aufnahmen von Eigelbphantomen mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI.

a) Weißlichtaufnahme (BF 1; BZ = 0,5 s); b) NIRF-Aufnahme (660/735 nm; BF 1, BZ = 2,0 s); c) NIRF-Aufnahme (660/735 nm; BF 2, BZ = 1,0 s). Je 1 ml Eigelb wurde mit 100 μl PBS mit DY-676-Konzentrationen von 0-2 μM DY-676 versetzt und denaturiert. Die rote Markierung in Abb. b) beschreibt eine Region of Interest (ROI). Die Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Dabei wurde, ebenso wie bei den Phantomversuchen mit Schweinefleisch, ein linearer Anstieg der Fluoreszenz mit steigender Belichtungszeit für die Konzentrationen von 0 bis $1 \mu\text{M}$ DY-676 bei BF 1 (siehe Abb.10 a) verzeichnet. Außerdem wurde auch hier ein Erreichen des Detektions-Maximums des Bildgebungsinstruments bonSAI mit steigender Belichtungszeit für die Konzentrationen von 0,2 bis $2 \mu\text{M}$ DY-676 bei BF 2 (siehe Abb. 10 b) festgestellt.

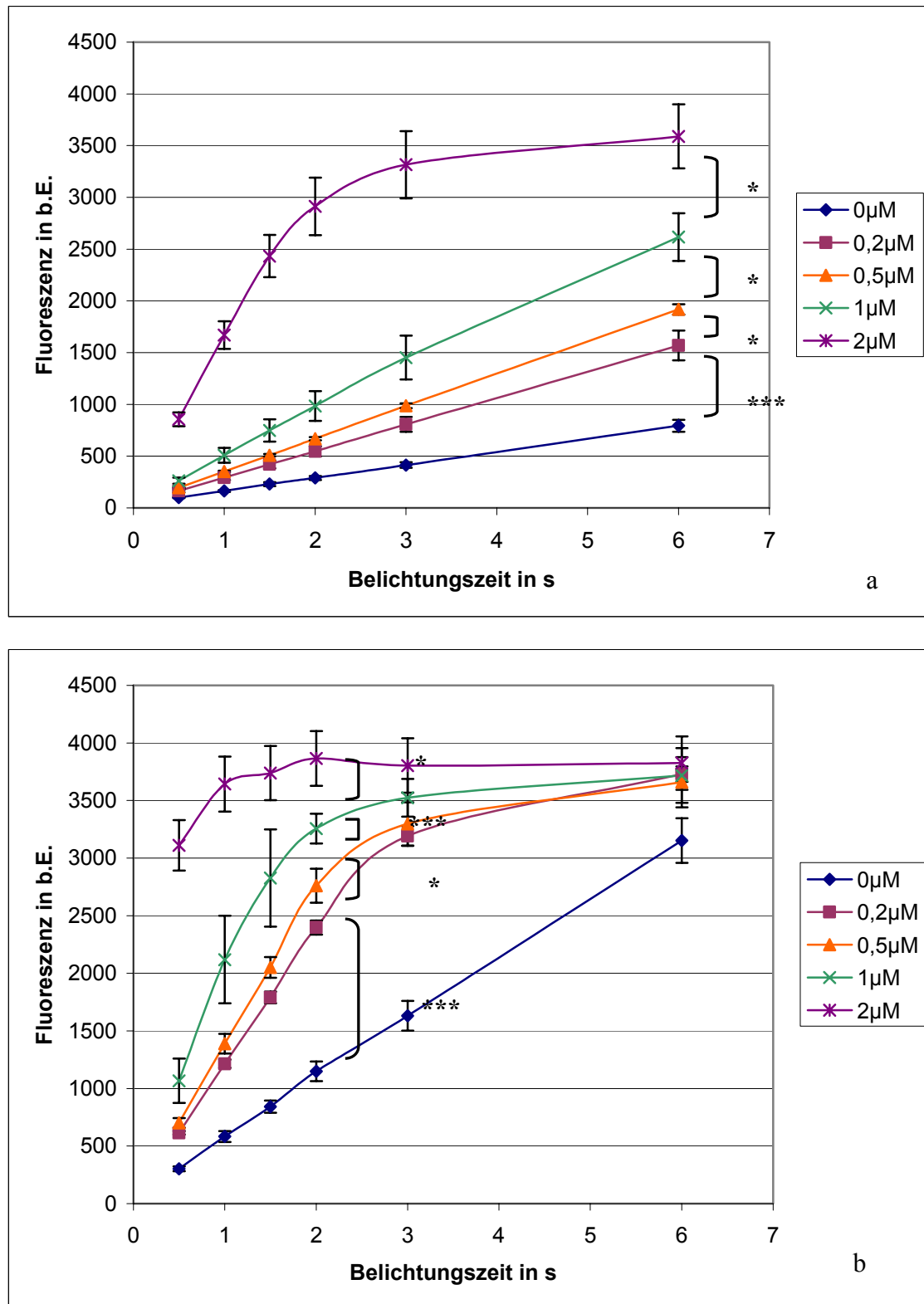


Abb. 10: Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Belichtungszeit ermittelten Fluoreszenzintensitäten der Eigelbphantome (ROI-basiert).

a) Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen bei BF 1; b) Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen bei BF 2. Je 1 ml Eigelb wurde mit 100 μ l PBS mit verschiedenen DY-676-Konzentrationen versetzt, denaturiert und im Bildgebungssystem bei verschiedenen BZ untersucht (660/735 nm, BZ 0,5-6 s). * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$

Für alle Konzentrationen von DY-676 wurden mittels zweiseitigen Student's t-Test signifikante Unterschiede in ihrer jeweiligen Fluoreszenz zur nächstgeringeren bzw. nächsthöheren Konzentration ($p < 0,01$ bzw. $0,05$) bei BF 1 für alle Belichtungszeiten und bei BF 2 für Belichtungszeiten bis 2 s ermittelt.

5.2 Charakterisierung der spezifischen Sonde

Bei der Auftrennung des Reaktionsgemisches aus Minigastrin und DY-676 mit Hilfe der HPLC wurden nach Retentionszeiten von etwa 18, 27, 28 und 29 Minuten Fraktionen eluiert (siehe Abb. 11). Die erste Fraktion zeigte nur bei 280 nm ein Absorptionssignal und entsprach somit dem ungekoppelten Minigastrin. Die zweite und dritte Fraktion zeigten sowohl bei 280 nm als auch bei 670 nm ein Absorptionssignal und enthielten demzufolge das an DY-676 gekoppelte Minigastrin. Die beiden weiteren Fraktionen zeigten vor allem bei 670 nm Absorptionssignale und verhältnismäßig geringe Signale bei 280 nm. Da davon auszugehen war, dass die nach 27 min eluierte Fraktion das meiste Peptid enthielt, wurde diese aufgefangen und nach Einengen und Solubilisieren als spezifische Sonde Mini-DY für die folgenden Versuche genutzt.

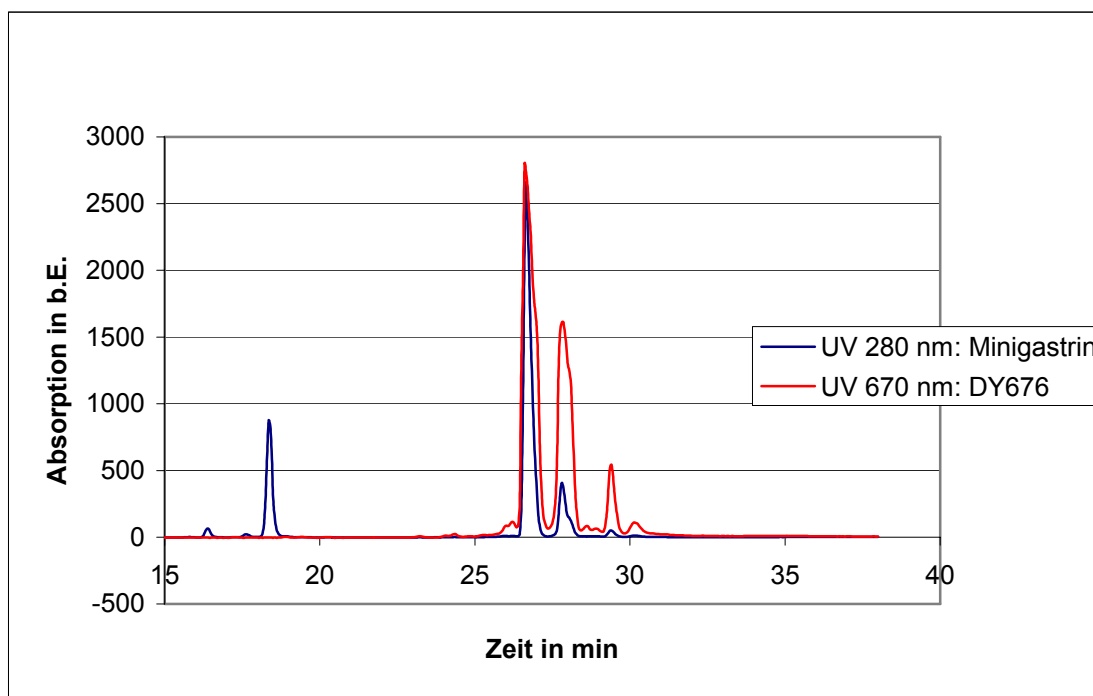


Abb. 11: Während der HPLC-Aufreinigung des Reaktionsgemisches aus Minigastrin und DY-676 aufgezeichnete Absorptionsspektren des Eluates bei 280 (Minigastrin) bzw. 670 nm (DY-676). Nach ca. 18 min wurde die erste Fraktion eluiert, welche nur ein Absorptionssignal von 280 nm zeigte (ungekoppeltes Minigastrin). Nach 27 min wurde ein Absorptionssignal sowohl für 280 als auch für 670 nm verzeichnet (gekoppeltes Peptid). Das Absorptionsspektrum ist repräsentativ für 5 HPLC-Durchläufe.

Die Messung der Absorption der hergestellten Sonde Mini-DY bei 665 nm am Photospektrometer (Ultrospec 4300 pro) und die Ermittlung der Konzentration des Farbstoffs DY-676 mittels Lambert-Beer'schen Gesetzes ergab eine DY-676-Gesamtkonzentration von 0,68 $\mu\text{mol/ml}$. Da ein Dye-Protein-Verhältnis von 1 aufgrund thermodynamischer Überlegungen (siehe 6.2) angenommen wurde, konnte mit Hilfe der zuvor berechneten Farbstoffkonzentration eine Proteinkonzentration von 0,59 mg/ml ermittelt werden. Damit wurde etwa 60 % des eingesetzten Minigastrins (1 mg) in Sonde umgesetzt. Das Molekulargewicht der Sonde wurde in einer Höhe von 2,5 kDa erwartet (DY676 808,96 g/mol, Mingastrin 1742,8 g/mol).

5.3 *In vitro* – Zellversuche

5.3.1 Nachweis der CCK₂R-Sequenz der verschiedenen Zelllinien auf mRNA-Ebene

Nach der PCR mit Primern zum Nachweis der CCK₂R-Sequenz waren für HT29- und LS174T-Zellen DNA-Banden bei ca. 560 bp (LS174T und HT29) und 770 bp (nur HT29) sichtbar, wohingegen die A375-Zellen keine Bande zeigten (siehe Abb. 12). Die für das Haushaltsgen GAPDH detektierten Signale wiesen hingegen für alle drei Zelllinien vergleichbare Intensitäten auf (DNA-Banden bei 520 bp, siehe Abb. 13). Für A375-Zellen konnte demzufolge die Expression von CCK₂R-mRNA nicht nachgewiesen werden, wohingegen LS174T- und HT29-Zellen CCK₂R-mRNA exprimieren.

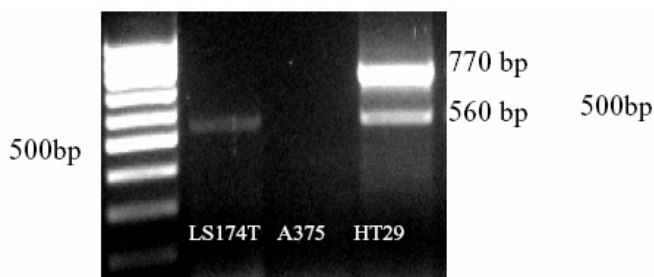


Abb. 12: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte zum Nachweis von CCK₂-Rezeptor-mRNA. Für LS174T-Zellen ist eine DNA-Bande bei ca. 560 bp, für HT29-Zellen eine DNA-Bande bei ca. 560 bp, sowie eine 770 bp-Bande (Splice-Variante nach Hellmich 2000) detektierbar. Der Versuch wurde einmal wiederholt.

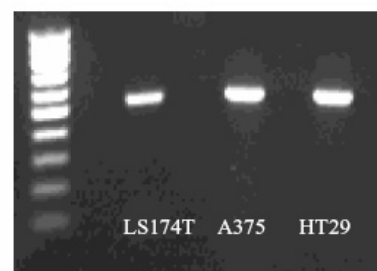


Abb. 13: Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte zum Nachweis von GAPDH-mRNA. Für alle Zelllinien sind DNA-Banden gleicher Stärke von 520 bp detektierbar

5.3.2 Darstellung der CCK₂R-Expression verschiedener Zelllinien nach Inkubation mit der spezifischen Sonde

5.3.2.1 NIRF-Darstellung der CCK₂R-exprimierenden Zellen mit dem Bildgebungs-instrument bonSAI

In allen Zellversuchen konnte ein stärkeres Fluoreszenzsignal der CCK₂R-positiven HT29- und LS174T-Zellen gegenüber den CCK₂R-negativen A375-Zellen nach Inkubation mit der Sonde mit Hilfe des Bildgebungsinstruments bonSAI detektiert werden, wobei das Signal der LS174T-Zellen im Durchschnitt am stärksten war (siehe Abb. 14). Mit steigender Sondenkonzentration nahm das Fluoreszenzsignal bei allen Zelllinien zu. Zellen, welche nicht mit der Sonde inkubiert wurden, zeigten nur eine geringe Eigenfluoreszenz. Der Unterschied der Fluoreszenzintensität zwischen CCK₂R-positiven Zellen (HT29 und LS174T) zu den CCK₂R-negativen Zellen (A375) wurde mit steigender Sondenkonzentration deutlicher. Der größte Unterschied der Fluoreszenzintensität zwischen Rezeptor-positiven zu Rezeptor-negativen Zellen, war nach einer einstündigen Inkubation und einer Sondenkonzentration von 2 µg Mini-DY/10⁶ Zellen zu erkennen (siehe Abb. 14 d). Für diesen Fall wurde in der statistischen Auswertung der im Bildgebungsinstrument bonSAI semiquantitativ ermittelten Fluoreszenzintensitäten mittels Student's t-Test ein signifikanter Unterschied zwischen A375- und HT29-Zellen ermittelt ($p < 0,05$) (siehe Abb. 15). Die LS174T-Zellen fielen in den Untersuchungen im Bildgebungssystem nach Inkubation mit Mini-DY durch eine hohe Standardabweichung ihres Mittelwerts aus 3 unabhängigen Versuchen auf (siehe Abb. 15).

Innerhalb einer Zelllinie wurden für A375- und HT29-Zellen mittels Student's t-Test signifikante Unterschiede in der Fluoreszenzintensität von Zellen welche mit 0,5 µg Mini-DY und Zellen, welche mit 2 µg Mini-DY inkubiert wurden, ermittelt ($p < 0,05$).

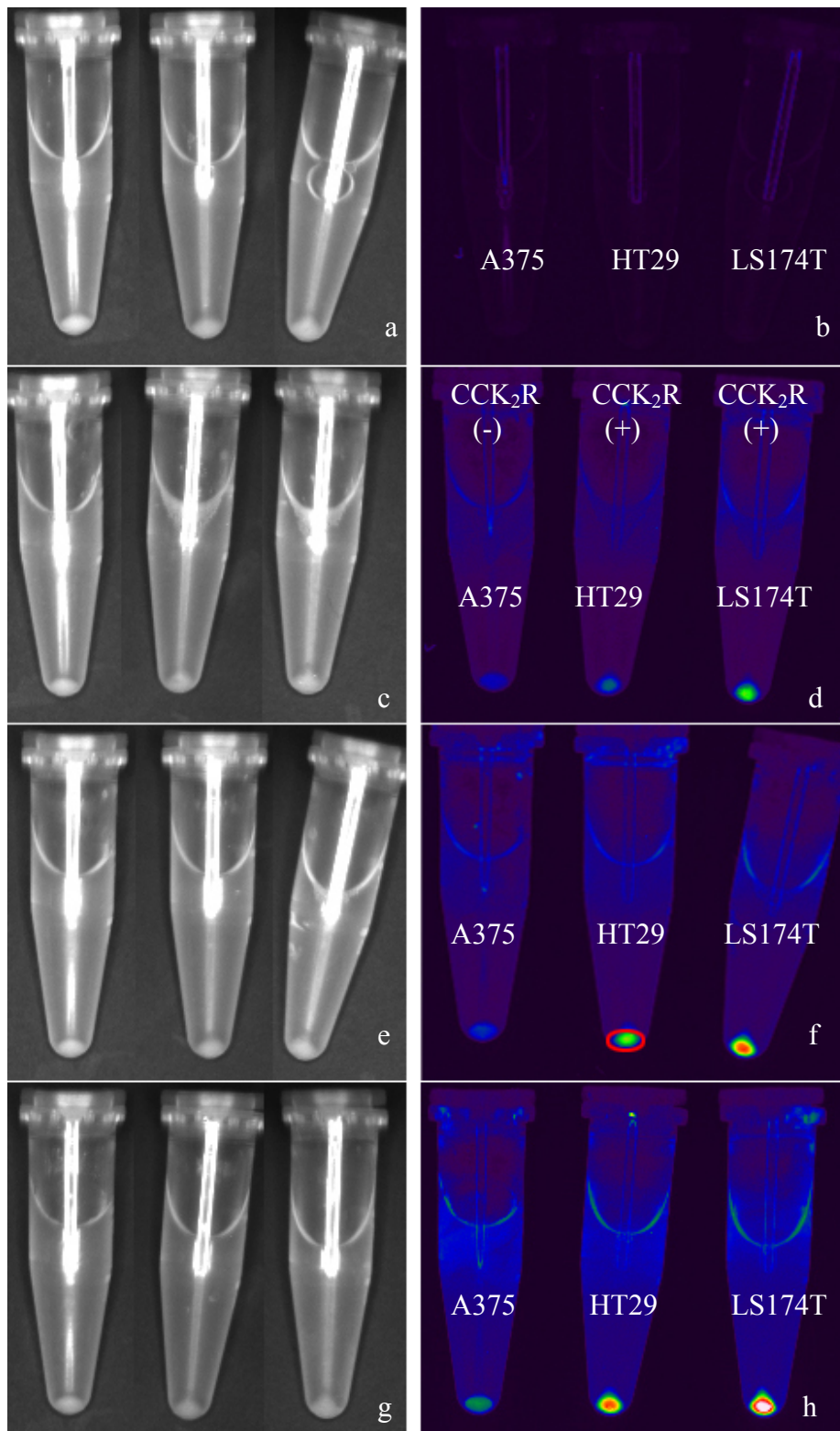


Abb. 14: Repräsentative makroskopische Weißlicht- und NIRF-Aufnahmen der mit Mini-DY-inkubierten Tumorzellen mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI – Variation der Sondenkonzentration. a), c), e) und g) Weißlichtaufnahmen (BF 2, BZ=0,5 s); b), d), f) und h) NIRF-Aufnahmen (660/735 nm, BF 2, BZ=0,5 s). Je 10^6 A375-, HT29- und LS174T-Zellen wurden **nicht** (b) bzw. 1 h mit **0,5 μ g** (d), **1 μ g** (f) bzw. **2 μ g** (h) Mini-DY inkubiert. Die Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

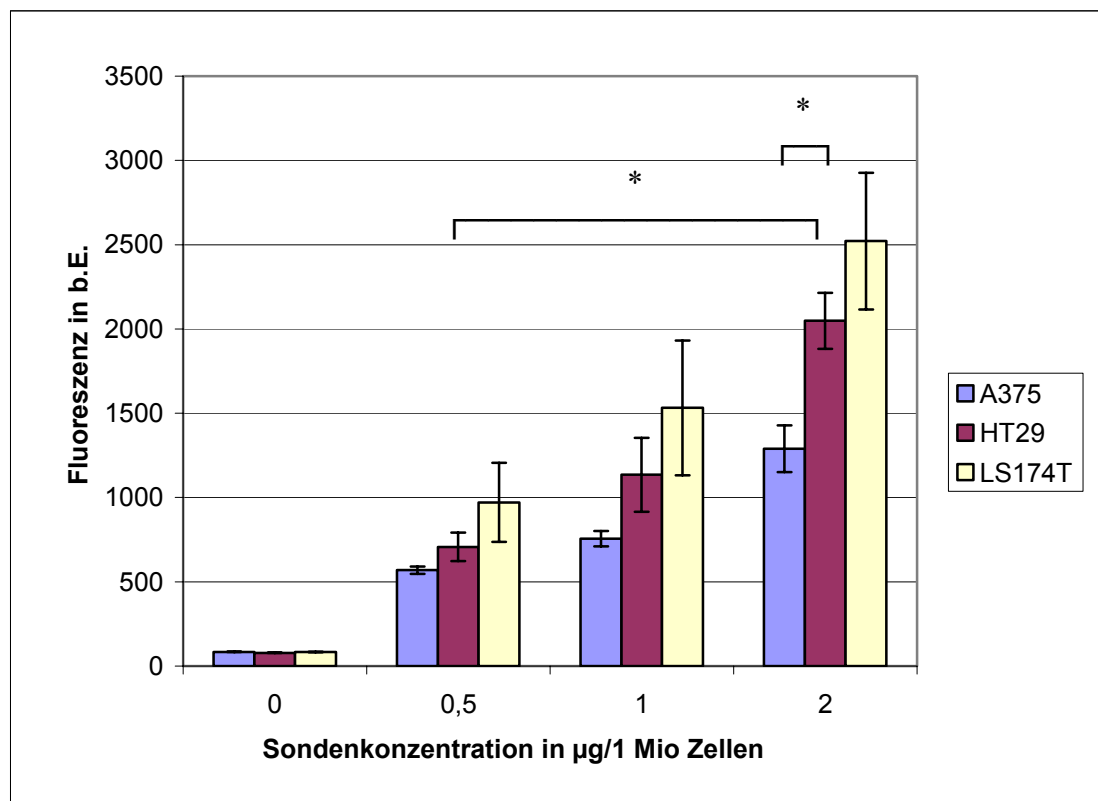


Abb. 15: Semiquantitative Auswertung der mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI ermittelten Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert) - Variation der Sondenkonzentration. Je 10^6 A375-, HT29- und LS174T-Zellen wurden 1 h bei 4°C mit verschiedenen Mini-DY-Konzentrationen inkubiert und im Bildgebungsinstrument bonSAI untersucht (660/735 nm, BF 2, BZ=0,5 s). Gezeigt werden die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler. * $p < 0,05$

Die Variation der Inkubationszeit bei gleich bleibender Sondenkonzentration von $2 \mu\text{g}/10^6$ Zellen führte zu keiner wesentlichen Veränderung der Fluoreszenzintensität der Zellen. So wurde bereits durch eine 5-minütige Inkubation der Zellen mit $2 \mu\text{g}$ Mini-DY ein deutlicher Unterschied zwischen CCK₂R-positiven HT29- und LS174T-Zellen und CCK₂R-negativen A375-Zellen erreicht. (siehe Abb. 16 und 17).

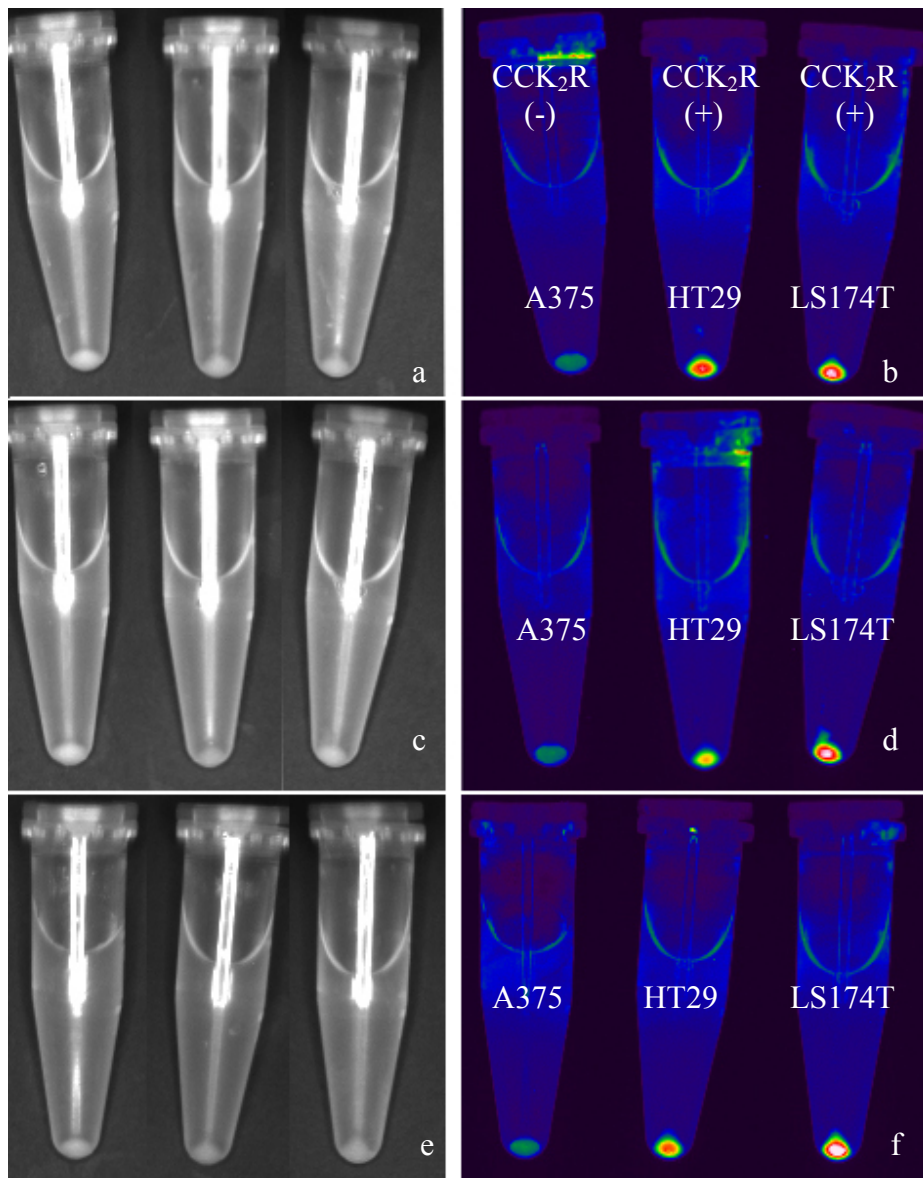


Abb. 16: Repräsentative makroskopische Weißlicht- und NIRF-Aufnahmen der mit Mini-DY-inkubierten Zellen mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI - Variation der Inkubationszeit.

a), c), e) und g) Weißlichtaufnahmen (BF 2, BZ=0,5 s); b), d), f) und h) NIRF-Aufnahmen (660/735 nm, BF 2, BZ=0,5 s). Je 10^6 A375-, HT29- und LS174T-Zellen wurden mit $2\ \mu\text{g}$ Mini-DY für **5 min** (b); **30 min** (d) bzw. **60 min** (f) inkubiert. Die Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

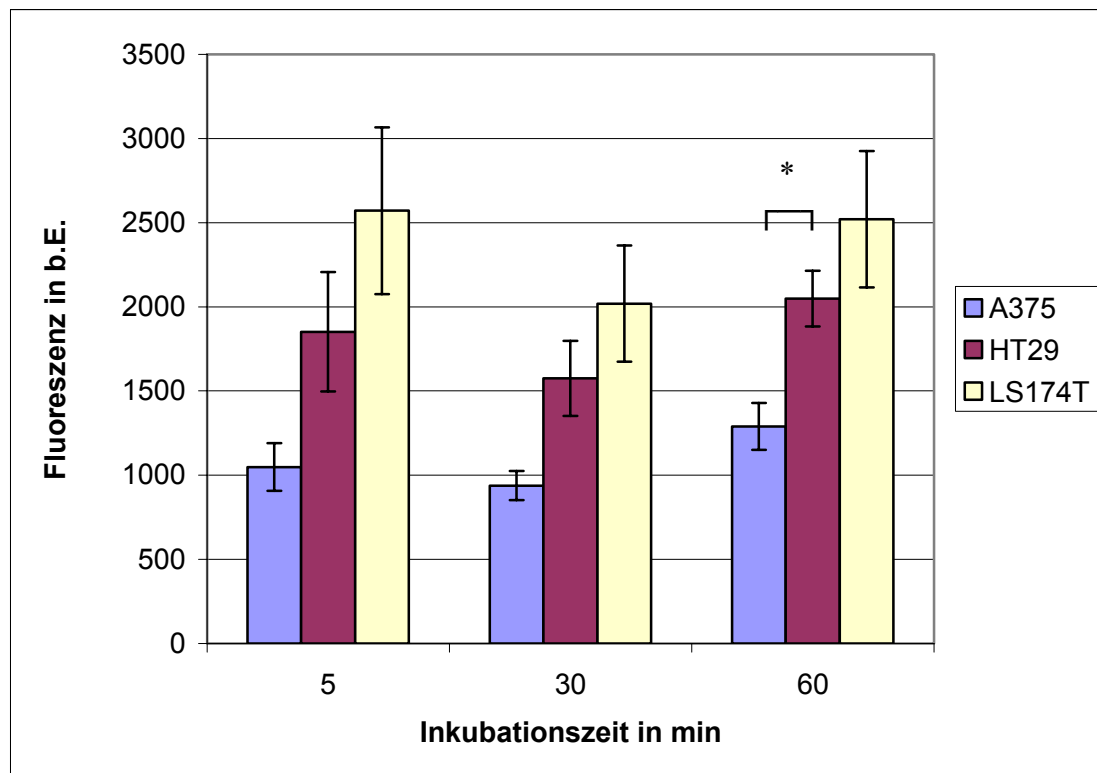


Abb. 17: Semiquantitative Auswertung der mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI ermittelten Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert) – Variation der Inkubationszeit. Je 10^6 A375-, HT29- und LS174T-Zellen wurden mit 2 μg Mini-DY verschieden lang inkubiert und im Bildgebungsinstrument bonSAI untersucht (660/735 nm, BF 2, BZ=0,5 s). Gezeigt werden die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler. * $p < 0,05$

5.3.2.2 Nachweis der CCK₂R-Expression der Zellen mittels FACS-Analyse

Sowohl HT29- als auch LS174T-Zellen zeigten bei der FACS-Analyse eine erhöhte mittlere Fluoreszenzintensität gegenüber A375-Zellen. In Abb. 20 und 21 erkennt man, dass mittels FACS-Analyse ebenso wie bei den Versuchen mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI, ein deutlicher Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität mit steigender Mini-DY-Konzentration, jedoch kein Anstieg der Fluoreszenzintensität mit steigender Inkubationszeit ermittelt wurde. Damit bestätigt die FACS-Analyse die mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI erzielten Ergebnisse.

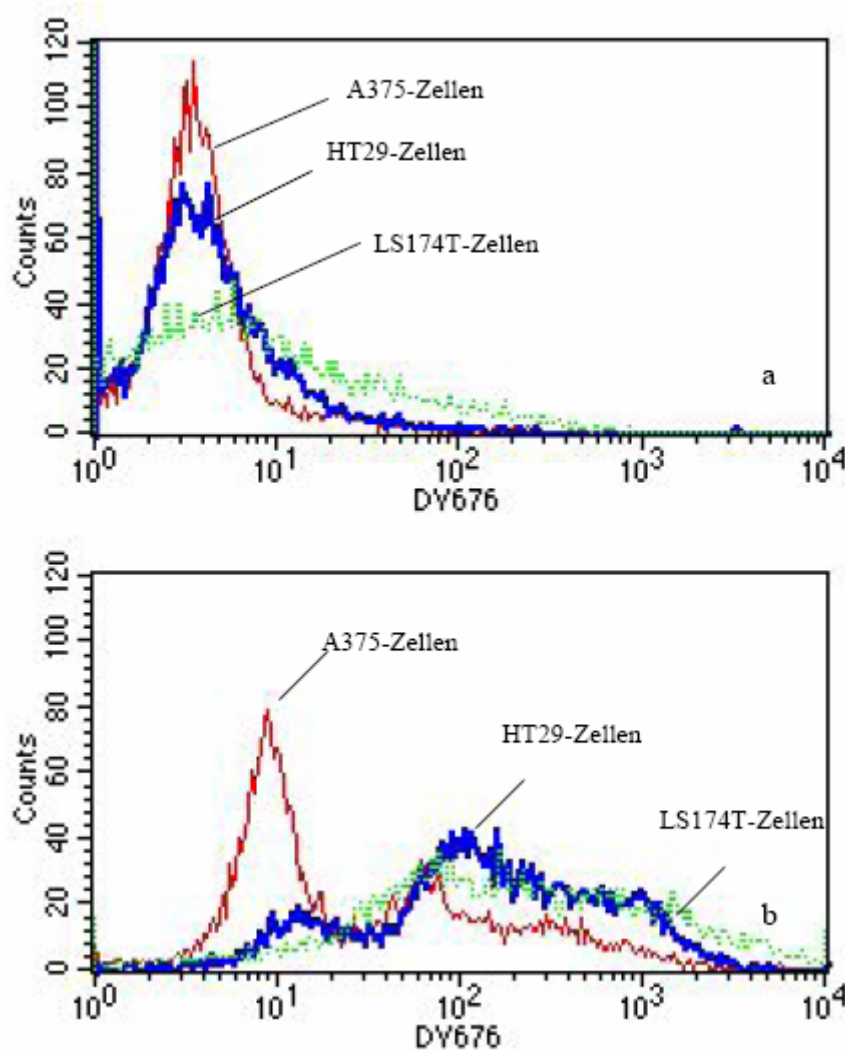


Abb. 18: Repräsentative Histogramm-Blots der FACS-Analyse der Zellen der einzelnen Zelllinien a) Native A375-, HT29- und LS174T-Zellen; b) A375-, HT29- und LS174T-Zellen nach 1-stündiger Inkubation bei 4°C mit 2 µg Mini-DY/ 10^6 Zellen. Die Versuche wurden in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

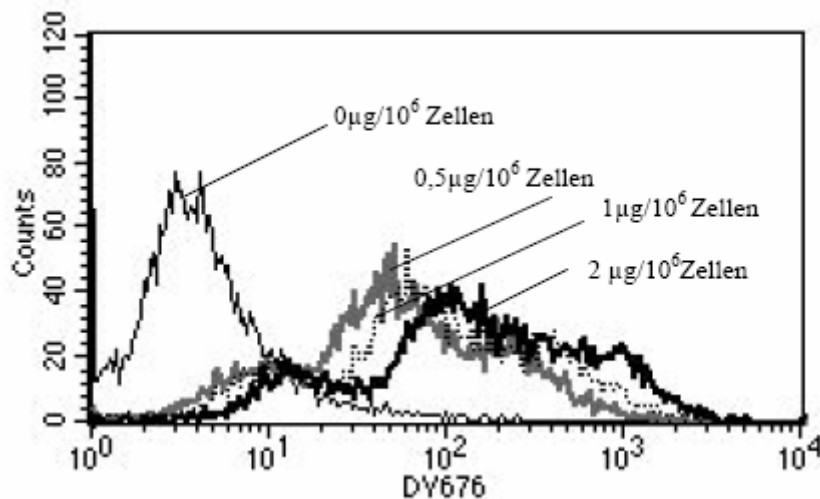


Abb. 19: Repräsentative Histogramm-Blots der FACS-Analyse von HT29-Zellen, welche 1 h bei 4°C mit unterschiedlichen Mini-DY-Konzentrationen inkubiert wurden. Die Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

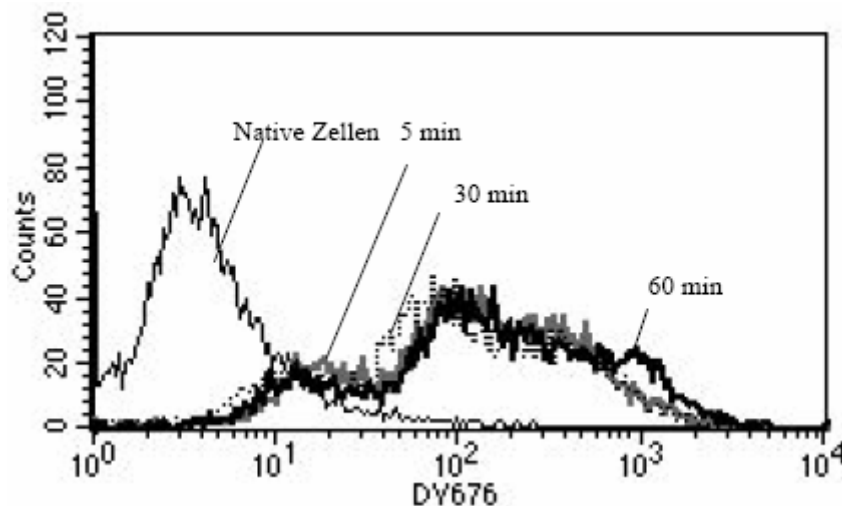


Abb. 20: Repräsentative Histogramm-Blots der FACS-Analyse von HT29-Zellen, welche zwischen 5 und 60 min bei 4°C mit $2\mu\text{g}$ Mini-DY/ 10^6 Zellen inkubiert wurden. Die Versuche wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

5.3.2.3 Nachweis der CCK₂R-Expression mittels CLS-Mikroskopie

In den CLSM-Aufnahmen von CCK₂R-positiven HT29- (Abb. 22) und von CCK₂R-negativen A375-Zellen (Abb. 23), welche jeweils 1 h mit $2\mu\text{g}$ Mini-DY/ 10^6 Zellen inkubiert wurden, ist deutlich erkennbar, dass die HT29-Zellen eine starke und teilweise lokalisierte Bindung von Mini-DY aufwiesen (rot), wohingegen die A375-Zellen nur eine schwache Fluoreszenz aufwiesen. Dieses bestätigt die aus den Versuchen mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI und der FACS-Analyse erzielten Ergebnisse. Aufnahmen

von LS174T-Zellen werden nicht gezeigt, da diese zu starker Agglomeration neigten und somit die Darstellung mittels CLSM erschwert wurde.

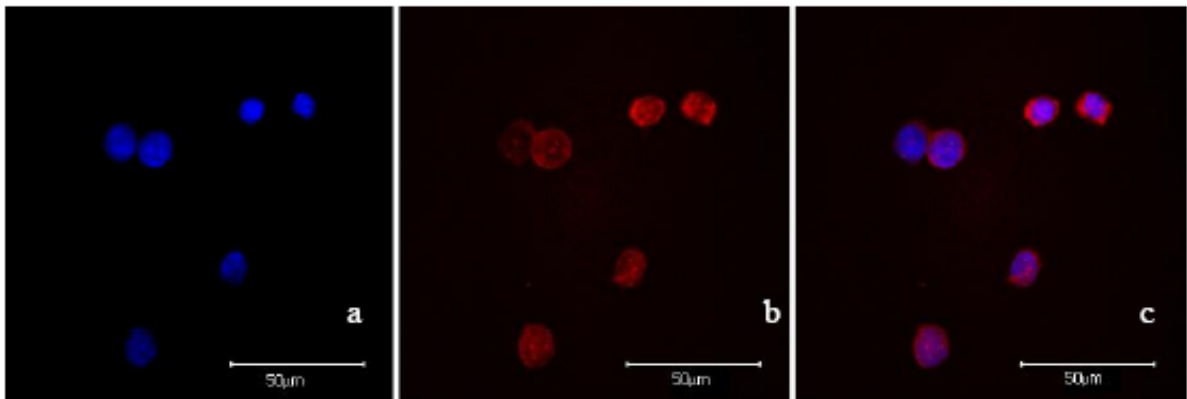


Abb. 21: Repräsentative CLSM-Aufnahmen von HT29-Zellen nach 1-stündiger Inkubation bei 4°C mit 2 µg Mini-DY/10⁶ Zellen. a) Darstellung der Zellkerne mit DAPI-Färbung (blau); b) Bindung von Mini-DY (rot); c) Kombination aus a) und b), Messbalken 50 µm. Die Versuche wurden 2fach wiederholt.

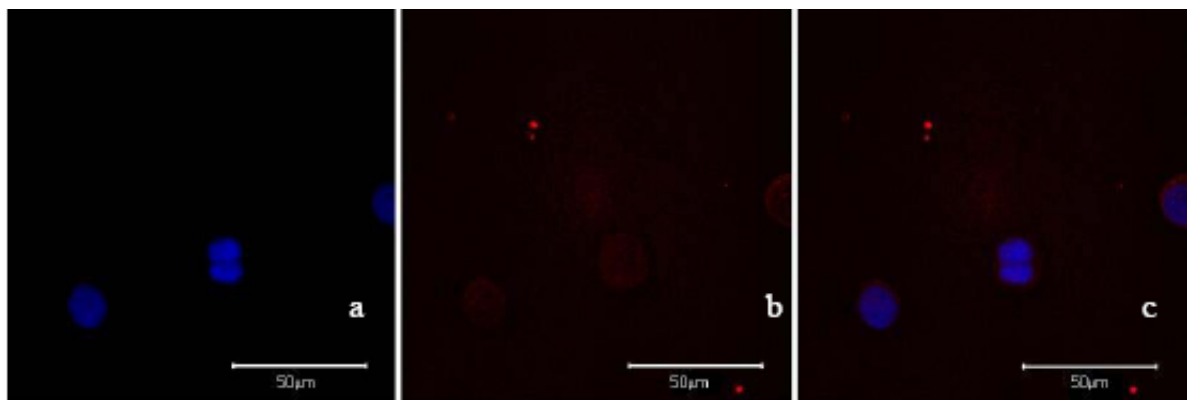


Abb. 22: Repräsentative CLSM-Aufnahmen von A375-Zellen nach 1-stündiger Inkubation bei 4°C mit 2 µg Mini-DY/10⁶ Zellen. a) Darstellung der Zellkerne mit DAPI-Färbung (blau); b) Bindung von Mini-DY (rot); c) Kombination aus a) und b), Messbalken 50 µm. Die Versuche wurden 2fach wiederholt.

5.4 NIRF-Bildgebung von CCK₂R-exprimierenden Tumoren *in vivo*

5.4.1 Detektion der CCK₂R-exprimierenden Tumoren *in vivo*

Bei den *in vivo*-Versuchen mit HT29- und A375-Tumor-tragenden SCID-Mäusen wurden für alle Tumoren nach i.v.-Injektion der Sonde die jeweilig höchsten Fluoreszenzintensitäten mit dem biooptischen Kleintierscanner direkt nach Sondenapplikation ermittelt. In einem Zeitraum von 8 bzw. 24 h im Anschluss an die Sondenapplikation nahm die Fluoreszenzintensitäten aller Tumore ab, wobei sich die der CCK₂R-positiven HT29-Tumoren weniger stark verringerten als die der geblockten HT29-Tumoren und der CCK₂R-negativen A375-Tumoren (Kontrollen) (siehe Abb. 26). Die Fluoreszenzintensitäten der HT29-Tumoren waren dabei im Allgemeinen stets höher als die der Kontrollen und die Abgrenzung zu den Kontrolltumoren verbesserte sich mit zunehmender Zeit post injektionem. So waren 2 h nach Applikation des Kontrastmittels die Fluoreszenzintensitäten der Tumoren noch miteinander vergleichbar (siehe Abb. 23), wohingegen die Fluoreszenzintensitäten der HT29-Tumoren 4 h nach Sondenapplikation deutlich höher als die der A375-Tumoren und der mit Minigastrin geblockten Tumoren waren (siehe Abb. 24). Der größte Signalintensitätsunterschied zwischen den CCK₂R-exprimierenden HT29-Tumoren und den CCK₂R-negativen A375-Tumoren bzw. den HT29-Tumoren, deren CCK₂-Rezeptoren mit Minigastrin besetzt waren, zeichnete sich 8h nach Sondeninjektion ab (siehe Abb. 25). Ein sehr starkes Fluoreszenzsignal mit Fluoreszenzintensitäten im Bereich der Detektionsgrenze des Bildgebungsinstruments bonSAI wurde im Bereich des Abdomen der SCID-Mäuse detektiert (siehe Abb. 23-25), wobei das Fluoreszenzsignal des Magens bei den mit Minigastrin geblockten Mäusen vergleichsweise geringer als bei den ungeblockten Tieren ausfiel.

Tumor: HT29 (CCK₂R-positiv)
Sonde: Mini-DY

Tumor: HT29 (CCK₂R-positiv)
Sonde: Mini-DY+Minigastrin
(Blockung)

Tumor: A375 (CCK₂R-negativ)
Sonde: Mini-DY

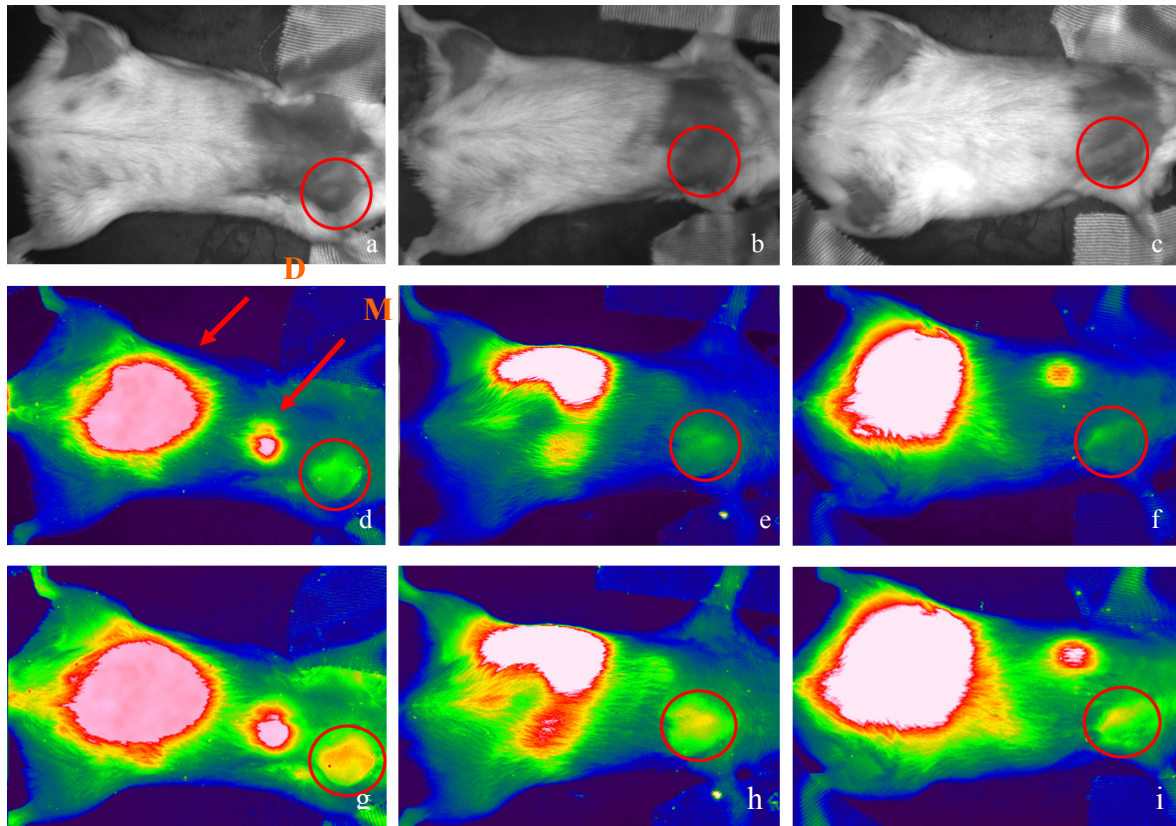


Abb. 23: Repräsentative makroskopische Weißlicht- und NIRF-Aufnahmen der Tumor-tragenden SCID-Mäuse mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI 2 h nach Injektion der Sonde
a) – c) Weißlichtaufnahmen (BF 1; BZ=0,5 s); d) – f) NIRF-Aufnahmen bei BF 1 (660/735 nm, BZ=6 s); g) – h) NIRF-Aufnahmen bei BF 2 (660/735 nm, BZ=2 s). a), d) und g) zeigen Aufnahmen der SCID-Maus mit HT29-Tumor, welcher 10 µg Mini-DY injiziert wurde; b), e) und h) Aufnahmen der SCID-Maus mit HT29-Tumor nach Injektion von 10 µg Mini-DY und 100 µg Minigastrin (Blockung) und c), f) und i) Aufnahmen der SCID-Maus mit A375-Tumor nach Injektion von 10 µg Mini-DY. Mit rotem Kreis ist jeweils der Tumor, mit rotem Pfeil das Magen (M)- und Darm (D)-Signal markiert. Es wurden je 5 Tiere pro Gruppe untersucht.

Tumor: HT29 (CCK₂R-positiv)
Sonde: Mini-DY

Tumor: HT29 (CCK₂R-positiv)
Sonde: Mini-DY+Minigastrin
(Blockung)

Tumor: A375 (CCK₂R-negativ)
Sonde: Mini-DY

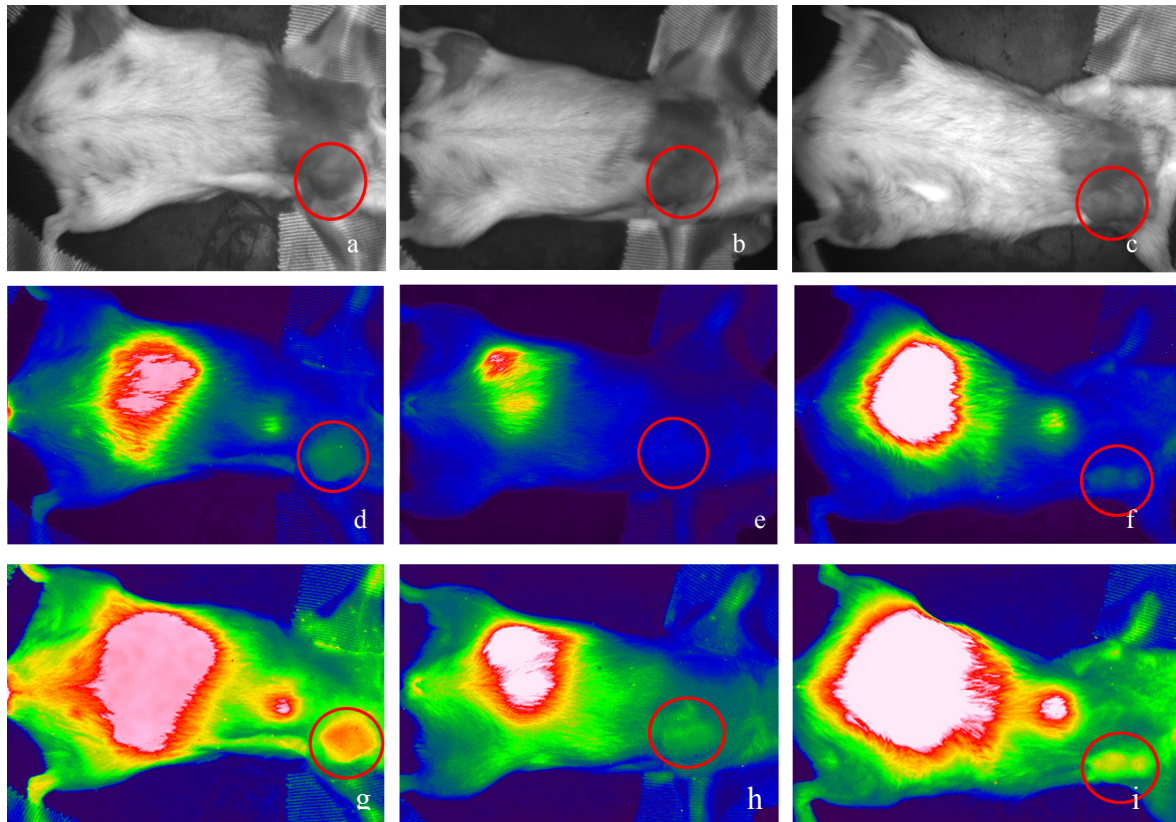


Abb. 24: Repräsentative makroskopische Weißlicht- und NIRF-Aufnahmen der Tumor-tragenden SCID-Mäuse mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI 4 h nach Injektion der Sonde
a) – c) Weißlichtaufnahmen (BF 1; BZ=0,5 s); d) – f) NIRF-Aufnahmen bei BF1 (660/735 nm, BZ=6 s); g) – h) NIRF-Aufnahmen bei BF 2 (660/735 nm, BZ=3 s). a), d) und g) zeigen Aufnahmen der SCID-Maus mit HT29-Tumor, welcher 10 µg Mini-DY injiziert wurde; b), e) und h) Aufnahmen der SCID-Maus mit HT29-Tumor nach Injektion von 10 µg Mini-DY und 100 µg Minigastrin (Blockung) und c), f) und i) Aufnahmen der SCID-Maus mit A375-Tumor nach Injektion von 10 µg Mini-DY. Es wurden je 5 Tiere pro Gruppe untersucht.

Tumor: HT29 (CCK₂R-positiv)
Sonde: Mini-DY

Tumor: HT29 (CCK₂R-positiv)
Sonde: Mini-DY+Minigastrin
(Blockung)

Tumor: A375 (CCK₂R-negativ)
Sonde: Mini-DY

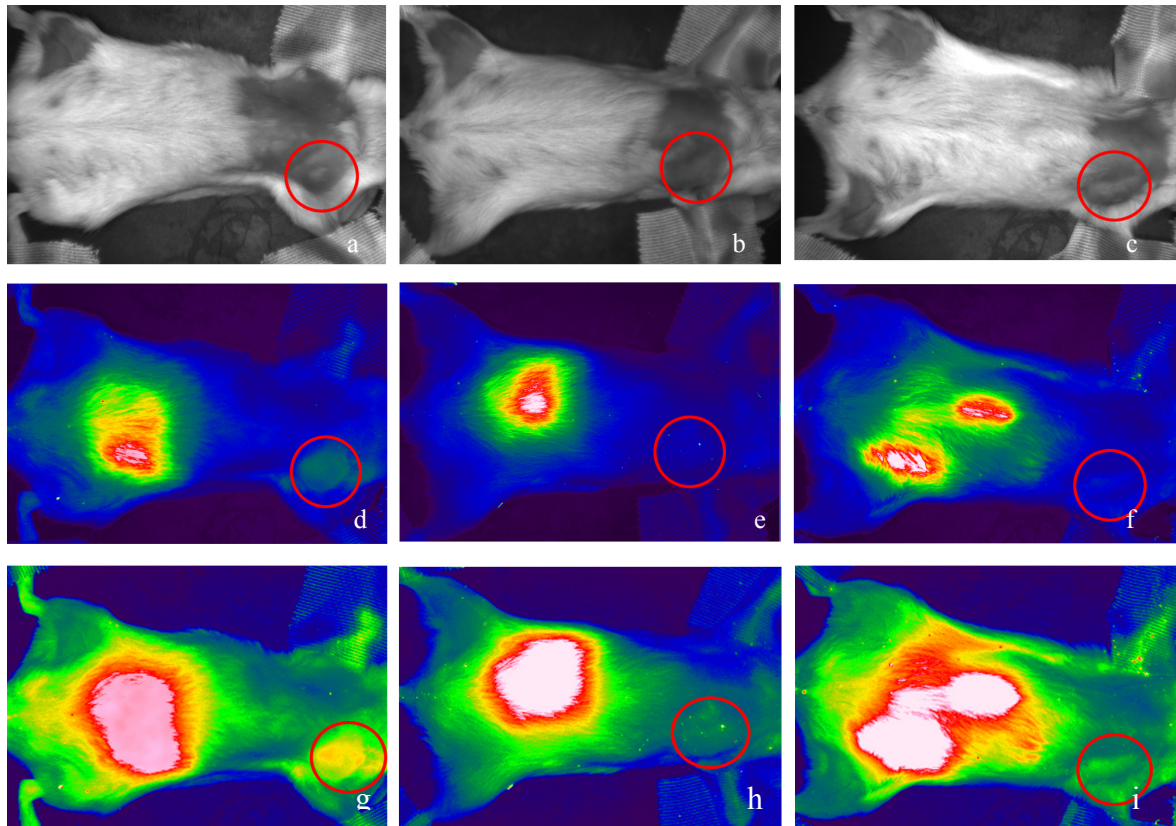


Abb. 25: Repräsentative makroskopische Weißlicht- und NIRF-Aufnahmen der Tumor-tragenden SCID-Mäuse mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI 8 h nach Injektion der Sonde
a) – c) Weißlichtaufnahme (BF 1; BZ=0,5 s); d) – f) NIRF-Aufnahmen bei BF 1 (660/735 nm, BZ=6 s); g) – h) NIRF-Aufnahmen bei BF 2 (660/735 nm, BZ=3 s). a), d) und g) zeigen Aufnahmen der SCID-Maus mit HT29-Tumor, welcher 10 µg Mini-DY injiziert wurde; b), e) und h) Aufnahmen der SCID-Maus mit HT29-Tumor nach Injektion von 10 µg Mini-DY und 100 µg Minigastrin (Blockung) und c), f) und i) Aufnahmen der SCID-Maus mit A375-Tumor nach Injektion von 10 µg Mini-DY. Es wurden je 5 Tiere pro Gruppe untersucht.

Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Fluoreszenzintensitäten der HT29-Tumoren zu den geblockten HT29-Tumoren 8 h nach Kontrastmittelinjektion sowohl bei BF 1 als auch bei BF 2 (Student's t-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$, siehe Abb. 26).

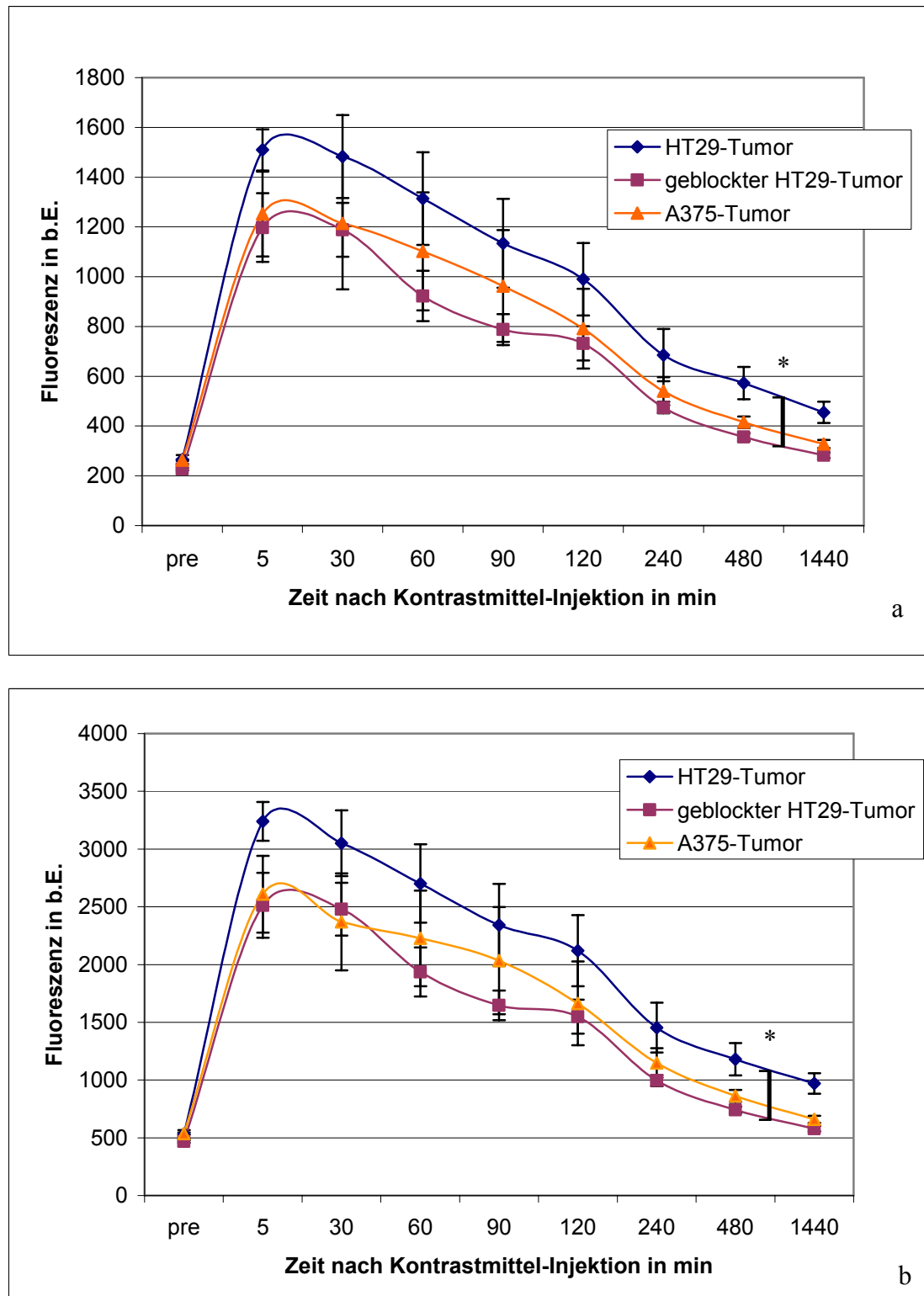


Abb. 26: Semiquantitative Auswertung der mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI ermittelten Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Tumore (ROI – basiert).

a) Absolutwerte der Fluoreszenzintensität der Tumoren bei BF 1 (660/735 nm; BZ=3 s); b) Absolutwerte der Fluoreszenzintensität der Tumoren bei BF 2 (660/735 nm; BZ=1,5 s). HT29- bzw. A375-Tumor-tragenden SCID-Mäusen wurden 10 µg Mini-DY bzw. 10 µg Mini-DY und 100 µg Mingastrin (geblockter HT29-Tumor) appliziert und anschließend die Tumorfluoreszenzen mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI für verschiedene Zeitpunkte nach Sondenapplikation bestimmt. Dargestellt werden Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen ± Standardfehler des Mittelwerts. * $p < 0,05$

Zudem wurden für den HT29-Tumor Tumor/Muskel-Verhältnisse der Fluoreszenzintensität von ca. 1,7 (direkt nach Sondenapplikation) bzw. 1,5 (8 h p.i.) ermittelt, wohingegen die Tumor/Muskel-Verhältnisse der Kontrollen zu Beginn Werte zwischen 1,2 und 1,4 hatten und sich im zeitlichen Verlauf nach der Sondenapplikation auf ca. 1,1 verringerten. 24 h nach Sondenapplikation zeigten die HT29-Tumoren noch Tumor/Muskel-Verhältnisse von 1,3 wohingegen die der Kontrollen einen Wert von 1 aufwiesen (siehe Abb. 27). Signifikante Unterschiede zwischen den Tumor/Muskel-Verhältnissen der HT29-Tumoren und denen der geblockten HT29-Tumoren wurden 8h nach Sondenapplikation bei BF 1 ($p<0,05$), sowie 4 h ($p<0,05$) und 8 h ($p<0,01$) nach Mini-DY-Injektion für BF 2 festgestellt. Im Vergleich der Tumor/Muskel-Verhältnisse der HT29-Tumoren mit denen der A375-Tumoren konnten signifikante Unterschiede 4 und 8h post injektionem für BF 1 und 8h nach Kontrastmittelapplikation bei BF 2 ermittelt werden ($p<0,05$). Beim Vergleich der beiden Kontrollgruppen fällt zudem auf, dass die Tumor/Muskel-Verhältnisse der geblockten HT29-Tumoren im Mittel geringfügig höhere Werte als die Tumor/Muskel-Verhältnisse der A375-Tumore aufwiesen.

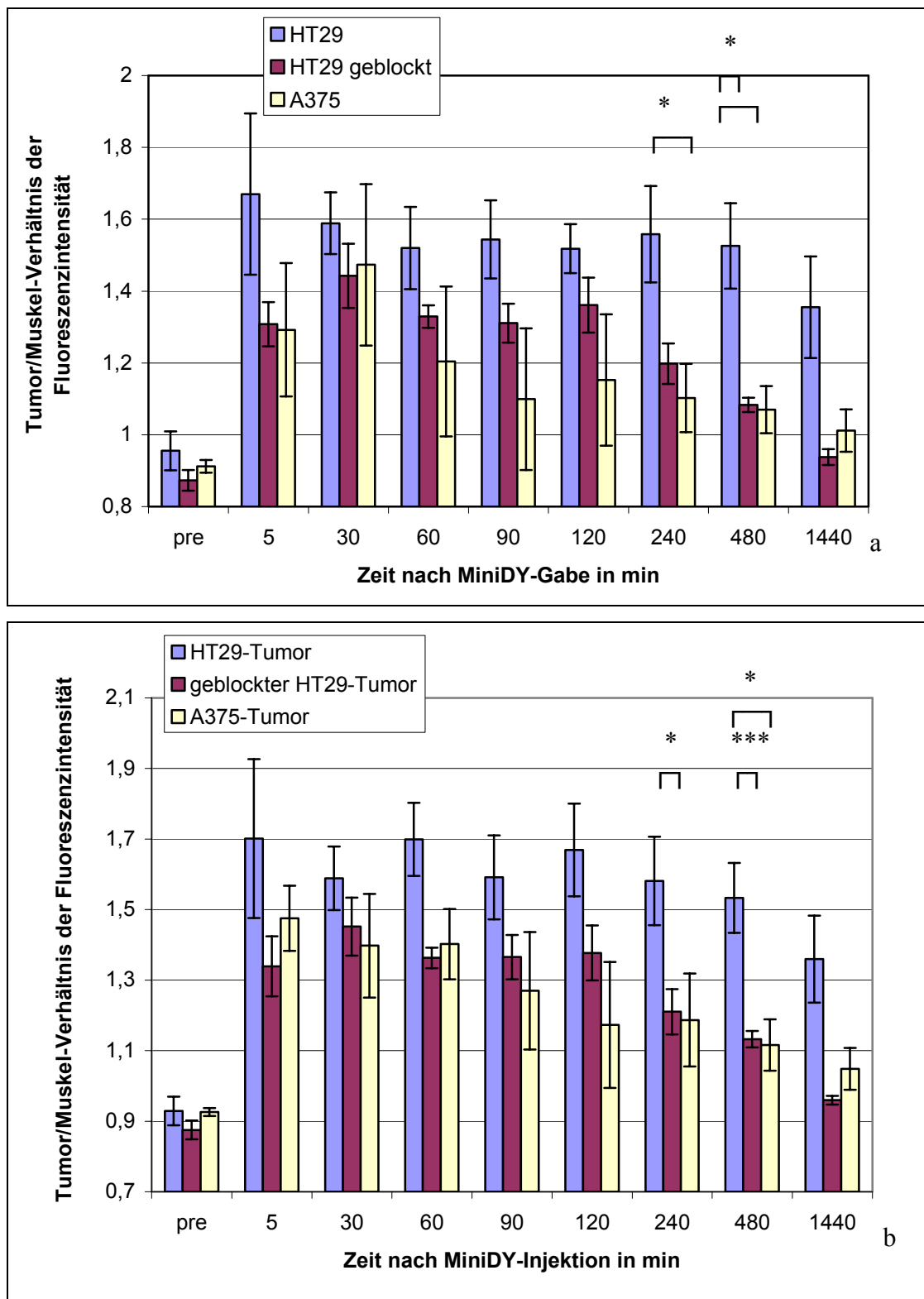


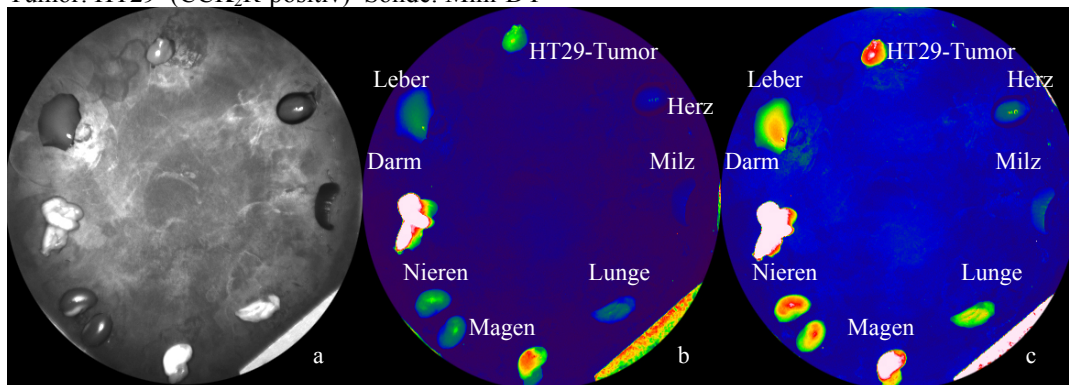
Abb. 27: Tumor/Muskel-Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Tumoren
 a) Tumor/Muskel-Verhältnisse bei BF1 (660/735 nm; BZ=3 s); b) Tumor/Muskel-Verhältnisse bei BF2 (660/735 nm; BZ=1,5 s). Es wurde der Quotient aus dem Absolutwert der Tumorfluoreszenz und dem Mittelwert der Fluoreszenz beider Hinterbeine zum jeweiligen Zeitpunkt nach Applikation von 10 µg Mini-DY bzw. 100 µg Minigastrin (geblockter Tumor) gebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler. * $P < 0,05$, *** $p < 0,01$

5.4.2 Abschätzung der Biodistribution der Sonde

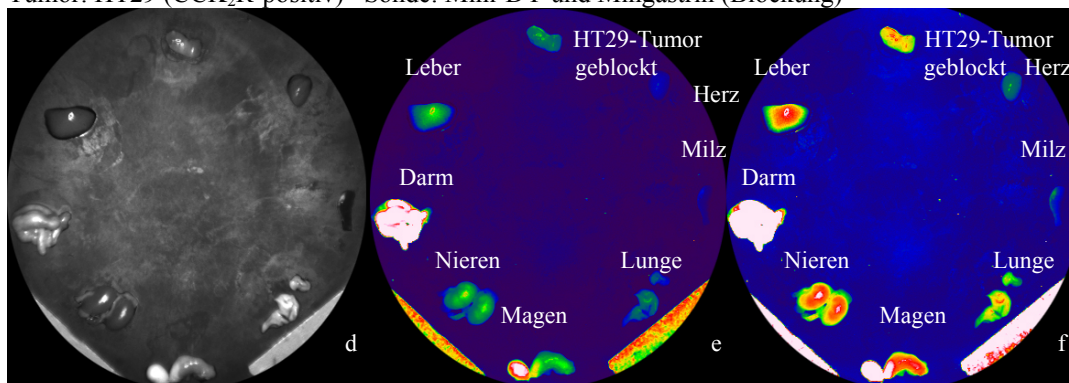
Bei der Messung der Fluoreszenzintensitäten der entnommenen Tumoren und Organe zeichnete sich ebenso wie bei den *in vivo*-Versuchen höhere Fluoreszenzintensitäten der HT29-Tumoren im Vergleich zu geblockten HT29- und A375-Tumoren ab (siehe Abb. 28). Außerdem war hier ebenfalls das starke Fluoreszenz-Signal des Magens und Darms erkennbar, wobei auch hohe Fluoreszenzsignale im Magen-Darm-Bereich von Mäusen, welchen keine Sonde appliziert wurde, detektiert wurden. Dabei lassen sich die in den Ganzkörperaufnahmen *in vivo* gesehenen Unterschiede zwischen den Fluoreszenzintensitäten der Mägen von ungeblockten zu geblockten SCID-Mäusen *ex vivo* nicht bestätigen.

Des Weiteren wurden Fluoreszenzsignale aus Leber, Niere und Lunge detektiert, welche mit denen der Tumoren vergleichbar waren, wobei nur für Leber und Niere ein deutlicher Unterschied in der Organfluoreszenz zwischen Mäusen mit und ohne Sondenapplikation zu erkennen war (siehe Abb. 29).

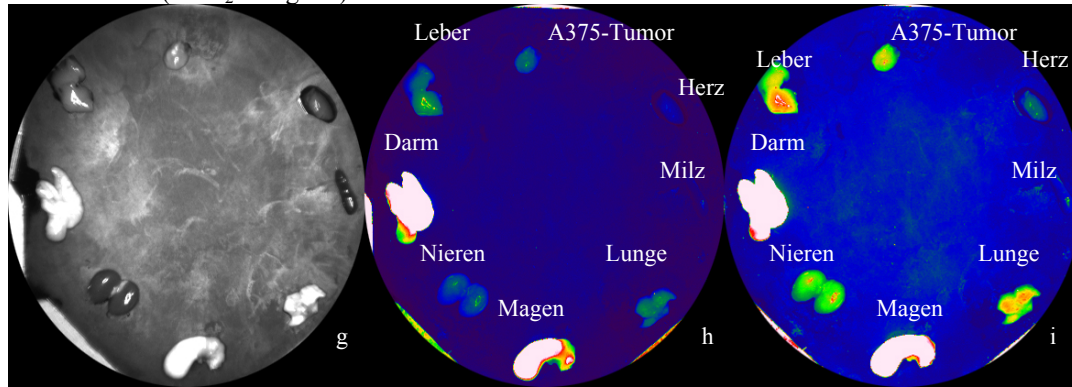
Tumor: HT29 (CCK₂R-positiv) Sonde: Mini-DY



Tumor: HT29 (CCK₂R-positiv) Sonde: Mini-DY und Mingastrin (Blockung)



Tumor: A375 (CCK₂R-negativ) Sonde: Mini-DY



kein Tumor implantiert

keine Sonde appliziert

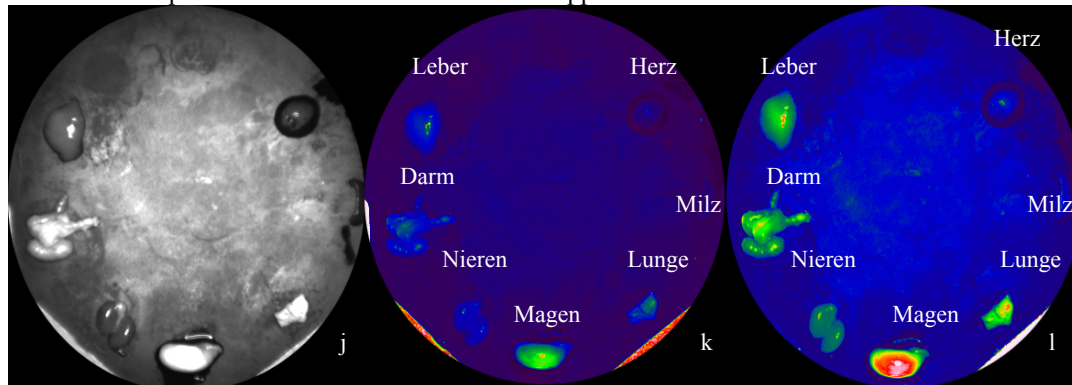


Abb. 28: Repräsentative makroskopische Weißlicht- und NIRF-Aufnahmen der Organe der SCID-Maus 8 h nach Sondeninjektion

a), d), g) und j) Weißlichtaufnahmen (BF 2; BZ=0,5 s); b), e), h) und k) NIRF-Aufnahmen (660/735 nm; BF 2, BZ=3 s); c), f), i) und l) NIRF-Aufnahme (660/735 nm; BF 2, BZ=6 s). Es wurden Tumoren und Organe von jeweils drei Tieren pro Gruppe entnommen.

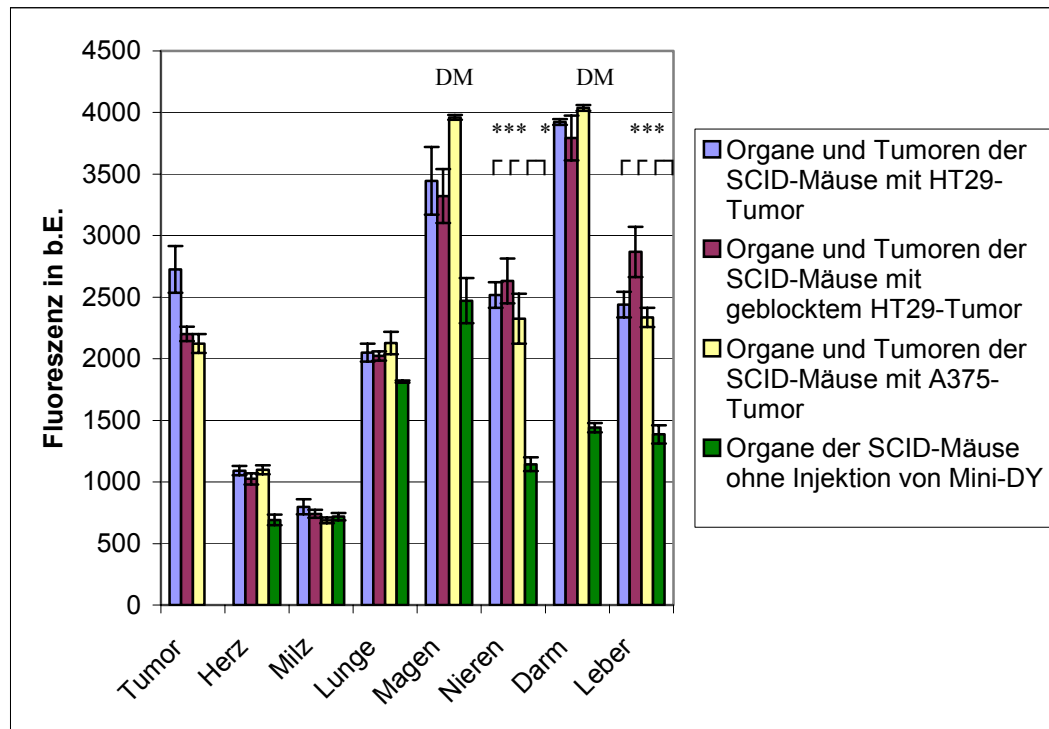


Abb. 29: Semiquantitative Auswertung der mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI ermittelten Fluoreszenzintensitäten der Tumoren und Organe *ex vivo* (ROI-basiert).

HT29- bzw. A375-Tumor-tragenden SCID-Mäusen wurden 10 µg Mini-DY bzw. 10 µg Mini-DY und 100 µg Mingastrin (geblockter HT29-Tumor) appliziert. Nach 8 h wurden die Tiere abgetötet, einzelne Organe sowie die Tumoren entnommen und die Fluoreszenzintensitäten (660/735 nm; BF 2; BZ=6 s) ermittelt. Es sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler dargestellt. DM=Detektionsmaximum des Bildgebungsinstruments bonSAI; * $p < 0,05$; *** $p < 0,01$

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine selektive Detektion von CCK₂-Rezeptor-exprimierenden Tumoren mit Hilfe eines neu entwickelten fluorophorhaltigen Kontrastmittels und eines neuartigen Detektionsinstruments in Form des biooptischen Kleintierscanners bonSAI grundsätzlich möglich ist. Dabei gelang die Darstellung der CCK₂-Rezeptor-exprimierenden Zellen sowohl in der *in vitro*- als auch in der *in vivo* – Situation.

In den zuerst durchgeführten Phantomversuchen konnte der Fluoreszenzfarbstoff DY-676 in Verbindung mit dem planaren Bildgebungsinstrument bonSAI untersucht werden und entsprechende optimale Parameter für die späteren Messungen ermittelt werden. Die *in vitro*-Untersuchungen ermöglichten zudem die Auswahl geeigneter Zellmodelle für die Darstellung CCK₂-Rezeptor-exprimierender Tumoren *in vivo*.

6.1 Parametercharakterisierung zur NIRF-Bildgebung in Vorversuchen

In den Phantomversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der DY-676-Konzentration bei gleich bleibender Belichtungszeit in einem linearen Anstieg der mit dem Bildgebungsinstrument ermittelten Fluoreszenzintensität resultierte. Das so genannte „Self Quenching“, d.h. ein Rückgang der Fluoreszenzintensität bei sehr hohen Fluorophor-Konzentrationen, wie von Hopt beschrieben (Hopt 2004), konnte nicht beobachtet werden, da die eingesetzten DY-676-Konzentrationen dafür zu gering waren. Auch eine Zunahme der Belichtungszeit führte beim Einsatz konstanter Farbstoffkonzentrationen zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität. Diese erklärt sich aus der steigenden exzitatorischen Energie, mit welcher das Fluorophor angeregt wird, und der längeren Detektion durch die CCD-Kamera.

Die Steigerung der Fluoreszenzintensität mittels Zunahme der Farbstoffkonzentration bzw. der Belichtungszeit war jedoch nur bis zum Erreichen des gerätebedingten Maximums von 4095 b.E. möglich. Wurden mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI Bilder im hellroten bis weißen Falschfarbenbereich erstellt, so wurde dieses Maximum erreicht. In den folgenden Versuchen war demzufolge darauf zu achten, Belichtungszeiten und

Fluorophorkonzentrationen zu wählen, welche im Bildgebungsinstrument bonSAI Fluoreszenzintensitäten erzielten, die unterhalb der Detektionsgrenze lagen. Andernfalls konnte keine exakte Aussage gemacht werden, ob die Fluoreszenz nicht noch höher war als ermittelt wurde.

Das Zusammenfassen zweier vertikaler und horizontaler Pixel zu einem Pixel durch Einstellung des Binning Faktors 2 resultierte in höheren Fluoreszenzintensitäten als die Einstellung des Binning Faktors 1. Dieses war zu erwarten, da durch das Zusammenfassen der Pixel eine höhere Empfindlichkeit der CCD-Kamera erreicht wird (Paech 2001). Das Zusammenfassen der Pixel führte dabei zu einer geringeren Bild-Auflösung.

Die Eigelbphantome zeigten eine homogene Verteilung des Fluorophors und eine sehr genaue Differenzierung zwischen verschiedenen Farbstoffkonzentrationen. Schon eine Erhöhung der Konzentration von 0,2 μM auf 0,5 μM DY-676 spiegelte sich im Bildgebungssystem bonSAI in einer signifikanten ($p > 0,01$ bzw. 0,05) Erhöhung der Fluoreszenzintensität wieder. Die Verteilung des Farbstoffs im Schweinefleisch war durch die unterschiedliche Struktur der Proben inhomogener, so dass hier erst eine Erhöhung von 0 μM auf 0,5 μM ($p < 0,05$) bzw. von 2 μM auf 4 μM ($p < 0,01$) in signifikanten Unterschieden der Fluoreszenzintensität resultierte. Das Eigelbphantom war demzufolge für die Charakterisierung des Fluorophors dem Schweinefleischphantom überlegen. Beide Phantome hatten jedoch den Vorteil, dass durch ihre raue Oberfläche keine störenden Oberflächenreflexionen auftraten, welche als scheinbare Fluoreszenzintensitäten detektiert werden würden. Diese störenden Einflüsse wurden in früheren Versuchen mit wässrigen Lösungen beobachtet (Deissler 2006) und konnten somit minimiert werden.

Die Phantomversuche zeigten demzufolge das Verhalten des Fluorophors DY-676 in Verbindung mit dem Bildgebungsinstrument bonSAI, d.h. die Erhöhung der Fluoreszenzintensität mit Zunahme der Farbstoffkonzentration bzw. der Belichtungszeit und der Einstellung des Binning Faktors 2, sowie das Erreichen des Detektionsmaximums von 4096 b.E. bei entsprechend hohen Konzentrationen bzw. Belichtungszeiten. Diese Charakterisierung konnte für die weiteren Untersuchungen genutzt werden.

6.2 Charakterisierung der spezifischen Sonde

In der vorliegenden Arbeit konnte eine erfolgreiche Kopplung von Minigastrin an das Fluorophor DY-676 gezeigt werden. So wurden bei der HPLC zwei Fraktionen (nach 27 und 28 min) eluiert, welche sowohl bei 280nm als auch bei 670 nm Signale zeigten. Während der Kopplung des Peptids an das Fluorophor wurde durch die nukleophile Substitution der NHS-Gruppe des DY-676-NHS-Esters durch eine freie Aminogruppe des Minigastrins (vermutlich N-terminal) eine kovalente Bindung des Peptids an die Carboxylgruppe des Fluoreszenzfarbstoffs erreicht. Da dem Peptid Minigastrin nur 2 freie Aminogruppen für die Bindung an DY-676 zur Verfügung standen, ist davon auszugehen, dass es nur im Verhältnis 1:1 oder 1:2 an den NHS-Ester des Fluorophors DY-676 binden konnte. Da keine der beiden Substanzen (Peptid und Fluorophor) im starken Überschuß in Reaktion gebracht wurden und mittels HPLC nur geringe Anteile ungekoppelten Peptids und freien Farbstoffs eluiert wurden, sind wir davon ausgegangen, dass die mittels HPLC nach 27 min eluierte Fraktion, welche die höchste Peptidmenge im Gegensatz zu den darauffolgenden Fraktionen enthielt, ein Dye-Protein-Verhältnis von 1 aufweist. Diese Fraktion wurde als spezifische Sonde Mini-DY bezeichnet und für die folgenden Versuche genutzt.

Die Ausbeute des Verfahrens betrug nach Durchführung von HPLC, Lyophilisieren und Solubilisieren ca. 60%. Die Sonde konnte über mehrere Wochen nach der Aufreinigung bei -20°C aufbewahrt werden, ohne dass sie im Versuch einen Funktionsverlust zeigte, allerdings erfordern genaue Aussagen zur Stabilität und zu Bindungseigenschaften der Sonde weiterführende Untersuchungen. Im Gegensatz zu der geschilderten Herstellung einer CCK₂R-spezifischen NIRF-Sonde wurden zur Herstellung radioaktiver Sonden Gastrinderivate zunächst an bifunktionelle Chelator-Agents (BFCAs) wie z.B. DTPA gekoppelt (Behr et al., 1999). Erst kurz vor der Untersuchung wurde der Peptid-Chelator-Komplex, wegen mangelnder Stabilität der Radionuklide, radioaktiv markiert. Dagegen stellt die gezeigte Markierung eines Peptids mit dem NHS-Ester eines Fluoreszenzfarbstoffs ein wesentlich einfacheres und schnelleres und noch dazu sehr effizientes Verfahren dar, welches in Sonden resultiert, die bei -20°C gelagert und anschließend sofort genutzt werden können.

6.3 *In vitro*-Zellversuche

Bei der Suche nach einem für die *in vivo*-Versuche geeigneten Zellmodell konnten mittels PCR-Analyse bei den CCK₂R-positiven Zellen Banden von ca. 560 bp gezeigt werden, wie sie nach Überprüfung der Genstruktur auch erwartet wurden. Die Fragmentgröße stimmt mit den Untersuchungen von Colucci et al. (2005) überein, welche ein Fragment von 562 bp für CCK₂-Rezeptor-positive Zellen ermittelten. Es fiel auf, dass in HT29-Zellen ein zweites Fragment von etwa 770 bp amplifiziert werden konnte. Aus den Untersuchungen von Hellmich et al. (2000) geht hervor, dass es eine Splice-Variante des CCK₂-Rezeptors gibt (CCK-BRi4sv), deren Fragmentgröße nach PCR mit den verwendeten Primern genau 769 bp beträgt. Jedoch konnten Colucci et al. (2005) die Existenz dieser Splice-Variante in HT29-Zellen anhand ihrer Untersuchungen nicht nachweisen. Da eine genauere Untersuchung dieses Sachverhaltes nicht Hauptthema dieser Arbeit war, wurde auf weiterführende Analysen verzichtet. Die LS174T-Zellen zeigten nach Inkubation mit der Sonde Mini-DY höhere Fluoreszenzintensitäten als die HT29-Zellen. Ein Zusammenhang einer veränderten Bindungsaffinität der Sonde an die Zellen mit der zusätzlichen Präsenz einer Splice-Variante des CCK₂-Rezeptors ist demzufolge möglich und muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Hellmich et al. (2000) zeigten jedoch in ihren Untersuchungen, dass ein Vorhandensein des zusätzlichen Introns 4 in der Splice-Variante des Rezeptors keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität von Gastrin an den CCK₂-Rezeptor zu haben scheint.

Insgesamt führte die Inkubation der in der PCR untersuchten Zellen mit Mini-DY für die CCK₂R-positiven Zellen sowohl im Bildgebungsinstrument bonSAI als auch in FACS und CLSM zu einem stärkeren Anstieg der Fluoreszenzintensitäten als dies für die Rezeptor-negativen A375-Zellen zu verzeichnen war. Dabei konnten die durch das neuartige NIRF-Bildgebungsinstrument bonSAI erhaltenen Ergebnisse durch die etablierten Methoden FACS und CLSM bestätigt werden. Eine Darstellung der CCK₂-Rezeptoren durch die hergestellte Sonde Mini-DY war demzufolge möglich.

Eine Inkubation der Zellen mit einer höheren Konzentration von Mini-DY resultierte sowohl bei CCK₂R-negativen als auch bei CCK₂R-positiven Zellen in einem Anstieg ihrer Fluoreszenzintensität. Das bedeutet einerseits, dass bei den CCK₂R-positiven Zellen, sobald mehr Sonde zur Verfügung stand, auch mehr Sonde an die Rezeptoren gebunden wurde, also noch nicht alle Rezeptoren mit Minigastrin bei geringeren Sondenmengen besetzt waren. Andererseits nahm auch die Fluoreszenz der mit Sonde inkubierten CCK₂R-

negativen A375-Zellen geringfügig zu. Es ist davon auszugehen, dass auch Zellen ohne Rezeptor die Sonde unspezifisch binden, wie die Ergebnisse der FACS-Analysen gezeigt haben. Licha et al. (2000) und von Wallbrunn et al. (2006) erklärten die von ihnen festgestellte unspezifische Bindung von fluorophorhaltigen Sonden unter anderem mit der Bindung des Fluorophors selbst an die Zelle. Die FACS-Analysen zeigten für einen Großteil der A375-Zellen nach Inkubation mit der Sonde Mini-DY nur einen geringfügigen Anstieg der Fluoreszenzintensität gegenüber nativen A375-Zellen, während für einen kleineren Anteil ein stärkerer Anstieg der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen war (unspezifische Bindung). LS174T-Zellen und HT29-Zellen hingegen zeigten für alle Sondenkonzentrationen einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität. Auch in den CLSM-Aufnahmen war für die A375-Zellen nur eine leichte Erhöhung der Fluoreszenz und demzufolge Bindung von Mini-DY erkennbar. Eine spontane Differenzierung von A375-Zellen, gefolgt von einer Expression von für A375-Zellen sonst nicht bekannten Rezeptoren, wie z. B. CCK₂-Rezeptoren, ist sehr unwahrscheinlich und wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Die geringfügige Bindung von Mini-DY an A375-Zellen wird von der für die CCK₂-positiven HT29-Zellen gezeigten stark übertroffen.

Die Veränderung der Inkubationszeit bei den *in vitro*-Untersuchungen führte zu keiner starken Veränderung der Fluoreszenzintensität der Zielzellen. So konnte schon nach einer 5-minütigen Inkubation mit Mini-DY ein deutlicher Unterschied zwischen Rezeptor-positiven und Rezeptor-negativen Zellen beobachtet und somit eine spezifische Bindung der Sonde an die Zellen erreicht werden. Anhand der angefertigten CLSM-Aufnahmen lässt sich nicht eindeutig ausschließen, dass eine Internalisierung des Rezeptor-Mini-DY-Komplexes stattgefunden hat, jedoch ist dies aufgrund der gewählten Inkubationsbedingungen (Inkubationstemperatur von 4°C) sehr unwahrscheinlich. Tarasova et al. (1997) inkubierten CCK₂R-positive Zellen mit Rhodamingrün-markiertem Heptagastrin und zeigten anschließend eine Erhöhung der Fluoreszenz der Zellen mit zunehmender Inkubationszeit. Dabei zeigten sie ebenfalls eine rasche Fluoreszenzerhöhung nach 5 min und anschließend nur noch eine geringe Fluoreszenzsteigerung bis zu einer Inkubationszeit von einer Stunde, welcher wieder ein starker Fluoreszenzanstieg folgte. Dieses wurde erklärt durch das periodische Rückführen der CCK₂-Rezeptoren auf die Zelloberfläche nach vollständiger Endozytose der Rezeptor-Liganden-Komplexe nach jeweils einer Stunde. Der Einfluß der Inkubationszeit auf die Fluoreszenzintensität der CCK₂R-positiven Zellen muss demzufolge mit längeren Inkubationszeiten und geänderten Inkubationsbedingungen weiterführend untersucht werden.

Wie oben geschildert konnte innerhalb der *in vitro*-Zellversuche eine Darstellung mit dem NIRF-Bildgebungsinstrument bonSAI gezeigt werden und somit ein für die *in vivo*-Versuche geeignetes Zellmodell ermittelt werden.

6.4 NIRF-Bildgebung CCK₂R-exprimierender Tumoren *in vivo*

Die Untersuchung von CCK₂R-positiven HT29- bzw. CCK₂R-negativen A375-Tumor tragenden SCID-Mäusen im biooptischen Kleintierscanner bonSAI zeigte, dass mit Hilfe der neu entwickelten Sonde Mini-DY eine deutliche Abgrenzung der Fluoreszenzintensität von HT29-Tumoren gegenüber der Fluoreszenzintensität des Umgebungsgewebes möglich war. Auch eine Unterscheidung der Fluoreszenzintensität von HT29-Tumoren gegenüber von mit Minigastrin geblockten HT29-Tumoren und A375-Tumoren war möglich. Demzufolge ist festzustellen, dass eine Darstellung von Tumoren mit Hilfe einer CCK₂R-spezifischen Sonde grundsätzlich möglich ist. Die Fluoreszenzintensität der HT29-Tumoren verringerte sich während des Beobachtungszeitraums von 24 h weniger stark als die der geblockten HT29-Tumoren und A375-Tumoren, welches für eine CCK₂-Rezeptor-spezifische Bindung der Sonde Mini-DY und eine dadurch bedingte verminderte Auswaschung der Sonde aus den HT29-Tumoren im Vergleich zu der der Kontrollen spricht.

Die Unterschiede der Absolutwerte der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Tumoren waren allerdings nicht so stark wie sie, ausgehend von den *in vitro*-Versuchen, erwartet wurden und waren erst nach 8h signifikant ($p < 0,05$). Dieses kann verschiedene Gründe haben. Dazu zählen die unspezifische Bindung der Sonde Mini-DY an die Zielzellen, die Variation der *in vivo*- zur *in vitro*-Situation und Vaskularisierungseffekte. Auf die einzelnen Punkte wird im Folgenden eingegangen.

Die schon in den *in vitro*-Versuchen gezeigte unspezifische Bindung der Sonde Mini-DY an die Zielzellen ist eine Erklärung für die geringe Abgrenzbarkeit der einzelnen Tumoren. Diese kann einerseits durch Wechselwirkungen des Fluorophors mit Plasma- und Oberflächenproteinen bedingt sein, welche seit kurzem in der optischen Bildgebung diskutiert und genauer untersucht werden. So zeigten z.B. Hansch et al. (2004) eine Bindung des Fluorophors CY5.5 an Plasmaproteine. Von Wallbrunn et al. (2006) machten ebenfalls, wie schon erwähnt, die Bindung des Fluorophors für die unspezifische Bindung der von Ihnen hergestellten NIRF-Sonde bestehend aus Cy5.5 und RGD-Peptid an

Tumoren, welche nur wenige oder keine Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptoren aufwiesen, verantwortlich. Diese Fluorophor-bedingten Wechselwirkungen sind ebenso mit ursächlich für Diskrepanzen zwischen Bildgebungsverfahren mit fluorooptischen und radioaktiv markierten Peptiden, sowie die Pharmakokinetik der Sonde-Mini-DY, welche später erörtert werden.

Vermutlich ist andererseits mit der geringen Molekülgröße des Minigastrins, welche die in der Einleitung beschriebenen Vorteile von Peptiden wie schnellere Bioverteilung und bessere Aufnahme in Tumorgewebe beinhaltet, die Gefahr der unspezifischen Bindung des Peptids an unterschiedliche Oberflächentrukturen vergesellschaftet.

Dass HT29- und A375-Zellen in der *in vivo*-Situation weniger stark voneinander abgrenzbar waren als in der *in vitro*-Situation, ist weiterhin damit erklärbar, dass beide Situationen aufgrund verschiedener Faktoren extrem variieren können. Zum einen wurde möglicherweise der CCK₂-Rezeptor von den HT29-Zellen *in vivo* nicht in einer zu der *in vitro*-Situation vergleichbaren Menge exprimiert. So sind Unterschiede in der Rezeptorexpression nicht nur für unterschiedliche Spezies, sondern auch zwischen kultivierten Tumorzellen und *in situ* gewachsenen Tumorzellen bekannt (Reubi et al. 2003). Gleiches gilt für das Vorhandensein der Rezeptor-mRNA, welche zwar in kultivierten Zellen isoliert werden kann, aber nicht zwangsläufig zu gleichen Proteinlevels in kultivierten wie *in situ* gewachsenen Tumorzellen führen muss. So spricht zwar ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Fluoreszenzintensitäten und den Tumor/Muskel-Verhältnissen der Fluoreszenzintensität der HT29-Tumoren gegenüber den mit Minigastrin-geblockten HT29-Tumoren und den A375-Tumoren für eine spezifische Markierung der CCK₂-Rezeptoren mittels der Sonde Mini-DY, jedoch muss die Expression der CCK₂-Rezeptoren in den in der vorliegenden Arbeit genutzten HT29-Tumoren mit Hilfe von PCR- bzw. Western-Blot-Analysen genauer untersucht werden. Mit Hilfe der Verwendung von Zellen, in welche CCK₂-Rezeptor-RNA stabil transfiziert wurde, wie z.B. CHO-Zellen, könnte möglicherweise ein noch größerer Unterschied der CCK₂R-exprimierenden Tumoren gegenüber CCK₂R-negativen Tumoren gezeigt und demzufolge eine höhere Spezifität erreicht werden. Verschiedene Arbeitsgruppen verwendeten diese Zelllinie bereits für Bindungsstudien u. ä. (Ahmed et al., 2001, Bellier et al., 2004).

Abgesehen davon ist Tumorgewebe im Gegensatz zu kultivierten Zellen morphologisch komplex. Tumoren sind oft durch eine Vielzahl nonneoplastischer Gewebe durchsetzt, wie zum Beispiel Epithel, glatte Muskulatur, Nerven und Zellen des Immunsystems, sowie

reaktiven Komponenten von Fibrose und Nekrose. Dabei kann auch Gewebe in den Tumor involviert sein, welches ebenso wie die Tumorzellen den entsprechenden Rezeptor ausbildet (Reubi 2003). Das kann ebenfalls ein Grund für die unspezifische Sondenaufnahme durch den A375-Tumor sein, da zum Beispiel für Monozyten und T-Lymphozyten die Expression von CCK₂-Rezeptoren beschrieben wurde (Noble et al., 1999).

Auch die Vaskularisierung der Tumoren hat einen Einfluß auf die Unterscheidung der einzelnen Tumoren. Direkt nach Kontrastmittelapplikation ist aus allen Regionen, welche stark durchblutet sind, eine hohe Fluoreszenzintensität zu erwarten, da es hier zu einer unspezifischen Akkumulation der Sonde nach deren Extravasation kommt. Maligne Tumoren zeichnen sich zumeist durch eine ausgeprägte Vaskularisierung aus und besitzen die Möglichkeit selbstständig Gefäße auszubilden (Choe und Lee, 2007). Dieses wird oftmals in der diagnostischen Bildgebung zur Detektion von Tumoren genutzt und ist sogar erwünscht, da bereits wenige Minuten bis Stunden nach Kontrastmittelapplikation eine Diagnose möglich ist, wie z.B. für das sogenannte „Dynamic MRM“ gezeigt wurde (Reichenbach et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch erst mit zunehmender Zeit nach Injektion der Sonde Mini-DY die Unterschiede zwischen CCK₂R-positiven Tumoren zu geblockten und CCK₂R-negativen Tumoren größer, da die Vaskularisierung weniger Einfluss auf die Signalintensität hatte, weil die Sonde Mini-DY vermutlich von den HT29-Tumoren Rezeptor-spezifisch aufgenommen und internalisiert wurde, wohingegen sie aus den Kontrolltumoren drainiert wurde. Für erstere konnte ein verlangsamter Rückgang der Fluoreszenzintensität im zeitlichen Verlauf gegenüber den Kontrolltumoren gezeigt werden. Das von Tarasova et al. (1997) für CCK₂-Rezeptor-exprimierende Tumorzellen ermittelte Internalisierungsmuster zeigt eine über mehrere Stunden anhaltende Zunahme der Fluoreszenzintensität der Tumorzellen nach Inkubation mit einem Fluorophor-markierten Mingastrinderivat, erklärt durch das periodische Rückführen der CCK₂-Rezeptoren auf die Zelloberfläche nach vollständiger Endozytose der Rezeptor-Liganden-Komplexe nach jeweils einer Stunde. Eine solche Internalisierung bei gleichzeitigem Auswaschen der Sonde Mini-DY führt zu höheren Verhältnissen von gebundener Sonde zu ungebundener Sonde im CCK₂R-positiven Tumor als in den Kontrolltumoren und somit zu einem verringerten Rückgang der Fluoreszenzintensität. Im Fall der Diagnostik von Tumoren mit Hilfe der spezifischen Sonde Mini-DY und einem optischen Bildgebungssystem ist es also sinnvoller spätere Zeitpunkte nach Kontrastmittelapplikation zu betrachten, da diese aussagekräftiger bezüglich der CCK₂R-

Expression sind. Dieses hat den Vorteil, dass die Diagnose präziser ist, da ein Tumor nicht nur unspezifisch aufgrund seiner Vaskularisierung detektiert wird, sondern eine Rezeptor-Expression auf Zellebene dargestellt wird, welches gerade die Früherkennung von Tumoren ermöglicht.

Ein Blocken der CCK₂-Rezeptoren mit Hilfe der Co-Injektion von Minigastrin beinhaltet den Vorteil, dass mögliche Einflüsse auf die Zellen, wie z.B. erhöhte CCK₂R-Expression, verringert wurden. Allerdings war hierdurch möglicherweise nicht gewährleistet, dass alle Rezeptoren ausreichend besetzt wurden, welches unter Umständen zu einer Aufnahme der Sonde Mini-DY in den geblockten Tumoren führte und somit den Unterschied der Signalintensität der HT29-Tumoren gegenüber der der geblockten Tumoren verringern konnte. Ein Pretargeting der Tumoren mit Mingastrin hätte vermutlich den Unterschied der Signalintensitäten vergrößern können. So erzielten andere Arbeitsgruppen durch die Injektion des ungekoppelten Peptids 1 h (Li et al., 2006) bzw. sogar 24 h (Ke et al., 2003) vor Injektion der Sonde und Durchführung der optischen Bildgebung eine 2- bis 2,5-fach erhöhte Fluoreszenzintensität des darzustellenden Tumors gegenüber der des geblockten Tumors, wohingegen in der vorliegenden Arbeit das Tumor/geblockten Tumor-Verhältnis 8 h nach Mini-DY-Applikation ca. 1,5 betrug. Jedoch konnten z.B. Chen et al. (2004) ein Verringern des Fluoreszenzsignals durch Blockung eines Tumors ebenfalls mit Hilfe von Co-Injektion eines ungekoppelten Peptids gegenüber dem ungeblockten Tumor um das 2,5-fache erreichen.

Bei den *in vivo*-Versuchen wurden für die HT29-Tumoren Tumor/Muskel-Verhältnisse der Fluoreszenzintensität von ca. 1,7 (direkt nach Sondenapplikation) bzw. 1,5 (8 h p.i. - post injektionem) ermittelt, wohingegen die Tumor/Muskel-Verhältnisse der Fluoreszenzintensität der Kontrollen zu Beginn zwischen 1,2 und 1,4 lagen und sich im Verlauf auf ca. 1,1 verringerten. Dabei unterschieden sich die Tumor/Muskel-Verhältnisse der HT29-Tumoren von denen der geblockten HT29-Tumoren und denen der A375-Tumoren 4 h und 8 h nach Injektion der Sonde Mini-DY signifikant. Im Vergleich zu den Absolutwerten der Fluoreszenzintensität der Tumoren bieten diese relativen Werte (Tumor/Muskel-Verhältnisse) noch eine bessere Unterscheidung der CCK₂R-positiven Tumoren von den Kontrollgruppen, da z.B. mögliche Unterschiede in der Sondenapplikation ausgeglichen wurden. Dabei sind die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Tumor/Muskel-Verhältnisse vergleichbar mit denen anderer Arbeitsgruppen, welche Peptide zur planaren optischen Bildgebung nutzten. So sind aus der Literatur Tumor/Nontarget-Gewebe-Verhältnisse von ca. 3 für ein Fluorochrom-gekoppeltes

Octreotatderivat über eine Zeit von 3 bis 24 h nach Kontrastmittelgabe (Becker et al., 2001) bekannt. Für die Darstellung des EGF-Rezeptors wurde eine halbe Stunde nach Kontrastmittelgabe ein Ratio von ca. 2 ermittelt (Ke et al., 2003). Von Wallbrunn et al. (2006) zeigten Ratios von 1,33 (3 h nach Injektion) bis 1,46 (24 h nach Injektion) für die Tumorbildgebung mit Hilfe von Cy5.5-markiertem RGD-Peptid. Außerdem konnten letztere zeigen, dass durch die Anwendung tomografischer Verfahren höhere Tumor/Muskel-Verhältnisse der Fluoreszenzintensität für die Darstellung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor-exprimierenden Tumoren erreicht werden können. So wurde 24 h nach Injektion der Sonde statt eines für die planare Bildgebung ermittelten Verhältnisses von 1,45 mittels tomografischer Bildgebung eines von 6,39 ermittelt. Dies wird zurückgeführt auf die bessere Abgrenzung von tiefer liegenden Non-target-Organen, welche eine starke Fluoreszenz zeigen, von der Tumorfluoreszenz (von Wallbrunn et al., 2006). Eine Verbesserung des Tumor/Muskel-Verhältnisses der Fluoreszenzintensität kann außerdem durch eine Optimierung der Sonde erreicht werden, wie zum Beispiel die Kopplung mehrerer Peptideinheiten an ein Fluorophor-Molekül. So stellten Ye et al. (2006) beispielsweise monomerische und dimerische Sonden für die Darstellung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor-exprimierenden Tumoren her, welche aus mehreren RGD-Peptid-Einheiten bestanden. Dabei beobachteten sie einen Anstieg der Rezeptoraffinität, eine schnellere Lokalisation der Sonde im Tumor und eine daraus folgende Erhöhung des Tumor/Muskel-Verhältnisses mit Zunahme der zu einem Fluorochrommolekül addierten Einheiten.

Vergleicht man die beschriebenen Tumor/Muskel-Verhältnisse der Fluoreszenzintensität, welche mit fluorooptischen Sonden erzielt wurden, mit denen aus Experimenten mit radioaktiven Sonden, so unterscheiden sich diese teilweise erheblich. So wurde für ein Somatostatinderivat mittels optischer Bildgebung ein Tumor/Muskel-Ratio von 3 (Becker et al., 2001) ermittelt, wohingegen aus der szintigrafischen Bildgebung Verhältnisse von zum Beispiel 26 bekannt sind (Lin et al., 2006). Für an Radionuklide gekoppelte RGD-Peptide wurden Tumor/Muskel-Verhältnisse von bis zu 15 angegeben (Liu und Edwards, 1999) im Vergleich zu den von Ye et al. (2006) oder von Wallbrunn et al. (2006) mittels planarer optischen Bildgebung ermittelten Verhältnissen von 2 bzw. ca. 1,5. Für das Vasointestinale Peptid (VIP) wurde mittels planarer optischer Bildgebung ein Tumor/Muskel-Ratio von etwa 2,5 beschrieben, für die szintigrafische von bis zu 6,4 (Barghava 2002, Thakur et al., 2003). Erklärt werden kann dies zum einen mit den bereits erwähnten unspezifischen Wechselwirkungen der Fluorophore mit dem

Umgebungsgewebe. Zum anderen erschweren in der optischen Bildgebung Reflexionen, Streuung und Absorption des Lichts in Nicht-Tumor-Geweben sowie deren Autofluoreszenz eine Auswertung der erhaltenen Fluoreszenzbilder, wohingegen in der szintigrafischen Bildgebung nur von dem tatsächlich im Tumor oder in Organen angereicherten Kontrastmittel ein Signal detektiert wird. Die tomografische optische Bildgebung kann diese Probleme teilweise beheben und, wie bereits erwähnt, zu höheren Tumor/Muskel-Verhältnissen führen. Im Vergleich des in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Tumor/Muskel-Verhältnisses zu dem von Behr et al. (1999) oder Nock et al. (2005) mit radioaktiv markierten Minigastrin erhaltenen ergibt sich ebenfalls eine große Diskrepanz, da für den letzteren Fall Ratios von bis zu 25 (Behr et al., 1999) oder sogar 144 (Nock et al., 2005) angegeben werden. Natürlich kann man erst dann beide Bildgebungsmethoden sicher vergleichen, wenn man den Versuchsaufbau standardisiert hat, d.h. mit exakt gleichen Peptid-Derivaten, gleichem Zell- und Tiermodell arbeitet und die durch die Kopplung bedingte Veränderung der Bioverteilung des Peptids beachtet (siehe unten).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine 24 h anhaltende Fluoreszenzemission der HT29-Tumoren gezeigt werden, wohingegen die Kontrolltumoren nach 4 bis 8 h kaum mehr Fluoreszenzsignale zeigten. Diese länger andauernde Fluoreszenzintensität der Rezeptor-positiven Tumoren im Gegensatz zu den Kontrollen und eine Erhöhung des Unterschieds zwischen den einzelnen Tumoren mit zunehmender Zeit nach Sondenapplikation ist mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche die planare optische Bildgebung von Rezeptor-exprimierenden Tumoren untersuchten, nahezu vergleichbar. So zeigten z.B. Becker et al. (2001) und Achilefu et al. (2002) eine gegenüber geblockten Tumoren und Umgebungsgewebe höhere Anreicherung von Somatostatinderivaten in Somatostatin-Rezeptor-exprimierenden Tumoren von 3 h bis 24 h p.i. bzw. 30 min bis zu 40 h p.i. Dabei wurden von Kontrolltumoren und Umgebungsgewebe schon nach 1 h nur noch sehr geringe Fluoreszenzsignale detektiert. Chen et al. (2004) und von Wallbrunn et al. (2006) ermittelten eine Anreicherung von Fluorophor-gekoppeltem RGD-Peptid 4 bis 24 h p.i. bzw. 3h bis 24 h p.i. in $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Rezeptor-exprimierenden Tumoren, wobei Kontrolltumoren und Umgebungsgewebe nach 24 h nur noch sehr geringe Fluoreszenzsignale im Gegensatz zu den Rezeptor-positiven Tumoren zeigten.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwar die höchste Anreicherung der Sonde Mini-DY und die höchsten Tumor/Muskel-Verhältnisse der Fluoreszenzintensität in kurzer Zeit nach Sondenapplikation erreicht, jedoch war die Abgrenzung von CCK₂-postiven Tumoren zu

geblockten bzw. Rezeptor-negativen Tumoren erst nach 4–8 h möglich. Die Arbeitsgruppen, welche die Darstellung CCK₂-Rezeptor-exprimierender Tumoren mittels radioaktiv markiertem Minigastrin untersuchten, ermittelten die höchste Anreicherung des Kontrastmittels im Tumor und CCK₂-Rezeptor-positiven Organen ebenfalls 1 h nach Kontrastmittelinjektion. Allerdings war in dieser Zeit schon ein ausreichend hohes Tumor/Muskel-Verhältnis erreicht und eine sehr gute Abgrenzung des Tumors zu dem geblockten Tumor möglich (Nock et al., 2005). Dennoch wird auch von Nock et al. für Demogastrin ein Anstieg der Tumor/geblocktem Tumor-Verhältnisses mit zunehmender Zeit nach Kontrastmittelgabe gezeigt (für ^{99m}Tc-Demogastrin 2 von 12 1h p.i. auf 17 4h p.i.), welches mit den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen tendenziell vergleichbar ist. Dass die für radioaktiv markiertes Minigastrin schon nach 1h gezeigte gute Abgrenzbarkeit des CCK₂-Tumors zu den Kontrollen durch die in der vorliegenden Arbeit hergestellte Sonde Mini-DY nicht erreicht wurde, ist vermutlich auf Wechselwirkungen des Fluorophors mit Plasma- und Membranproteinen zurückzuführen. So ist z.B. ebenso eine unterschiedliche Biodistribution zwischen radioaktiv und Fluorochrom-markiertem Minigastrin auffällig. Das von Nock et al. gezeigte Derivat wurde schnell im Tumor angeflutet und anschließend relativ schnell wieder über die Niere ausgeschieden, wohingegen es in der vorliegenden Arbeit aus dem Tumor langsam ausgewaschen wurde und dort nach 24 h immer noch detektierbar war, so wie es bereits für andere Fluorophor-haltige Kontrastmittel gezeigt wurde. Die Ausscheidung von Mini-DY aus dem Körper wird im Gegensatz zu radioaktiv markiertem Minigastrin wahrscheinlich nicht ausschließlich über die Niere, sondern zu gleichen Teilen über Niere und Leber erlangt, da hier die 8h p.i. detektierte Fluoreszenz der beiden Organe etwa gleich hoch war. Dieses spricht ebenfalls für eine Bindung der Sonde Mini-DY an Plasmaproteine. So würde bei einem Dye-Protein-Verhältnis der spezifischen Sonde Mini-DY von 1 ein Molekulargewicht von ca. 2,5 kDa eher ein Abbau über die Niere als über die Leber erwartet werden. Außerdem lässt die chemische Struktur der Sonde auf ein hydrophiles Verhalten schließen, welches ebenso einen Abbau über die Niere begünstigen würde. Bei einer Bindung an Plasmaproteine, wie z.B. Albumin, würde das Molekulargewicht jedoch auf über 70 kDa steigen und ein Abbau über die Leber erfolgen. Die mögliche Bindung des Fluorophors an Albumin muss demzufolge in weiterführenden Studien untersucht werden. Auch eine Bindung von Minigastrin an Plasmaproteine ist möglich. So wurde zum einen von Behr et al. (1999) ein Anstieg des Molekulargewichts eines relativ geringen Anteils der jeweils von ihnen untersuchten CCK-Analoga nach kurzer Seruminkubation gezeigt

und auf die von Reeve et al. (1994) erwähnten Gastrin-bindenden Proteine verwiesen. Allerdings ist die Bindung von Minigastrin an Plasmaproteine eher unwahrscheinlich, da sie ebenfalls bei den radioaktiven Sonden einen Einfluß auf die Biodistribution haben müsste. Diese wurden jedoch vorrangig über die Niere ausgeschieden, welches durch das für sie angegebene Molekulargewicht von nur ca. 2,2 kDa erklärbar ist. Der höhere Abbau des radioaktiv markierten Minigastrins über die Niere gegenüber Fluorophor-markiertem Minigastrin kann ebenfalls durch den Einfluss des an das radioaktiv markierte Derivat gekoppelten Chelatkomplexes DTPA auf die Aufnahme durch die Niere erklärt werden, wie sie von Langer und Beck-Sickinger (2001) für BFCAs beschrieben wurde. Auch Breeman et al. (2002) zeigten den Einfluß von DTPA auf die Biodistribution von Bombesinderivaten, indem sie diese teilweise an DTPA und teilweise an DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetat) koppelten und für die an DTPA gekoppelten Derivate die höchsten Nieren-Uptakes und geringsten Leber-Uptakes ermittelten. Smith-Jones et al. (1997) zeigten ebenso eine höhere Aufnahme ungekoppelten DTPAs in der Niere als in der Leber.

Bei der Beobachtung der Fluoreszenzintensität der Organe der SCID-Mäuse nach Sondenapplikation fällt auf, dass sehr hohe Fluoreszenzsignale im Bereich des Detektionsmaximums des Bildgebungsinstruments bonSAI aus Magen und Darm detektiert wurden. Die Anreicherung der Sonde im Magen erstaunt wenig, da im Magen das physiologische Vorkommen einer hohen Anzahl von CCK₂-Rezeptoren beschrieben wurde (Noble et al., 1999) und ebenfalls für die szintigrafische Bildgebung mit Minigastrin gezeigt wurde (Behr et al., 1999, Nock et al., 2005). Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit zwar *in vivo* nicht jedoch *ex vivo* ein Unterschied der Magensignale von ungeblockten zu geblockten Mäusen hergestellt werden. Dieses lag zum einen daran, dass eine genaue Auswertung der Signale durch die hohe Fluoreszenzstärke nicht möglich war, da beim Erreichen des gerätespezifischen Maximums keine Aussage über die tatsächlich ermittelte Fluoreszenzintensität zu treffen ist. Außerdem wurde auch von Mäusen, denen keine Sonde verabreicht wurde, ein hohes Fluoreszenzsignal des Magens detektiert. Dieses ist auf den darin enthaltenen Futterbrei und die glatte Beschaffenheit der Magenoberfläche zurückzuführen, welche in einer hohen Reflexion des anregenden Lichts resultierte. Demzufolge sind sowohl diese störenden Fluoreszenzsignale, sowie das physiologische Vorkommen von CCK₂-Rezeptoren in der Magenschleimhaut für das hohe Fluoreszenzsignal des Magens verantwortlich. Das aus dem Darm detektierte hohe Fluoreszenzsignal kann verschiedene Ursachen haben. So wurde zwar über das

Vorhandensein von CCK₂-Rezeptoren in der Darmschleimhaut bisher diskutiert und dieses eher ausgeschlossen (Smith und Watson, 2000, Matsushima et al., 1994), jedoch wird über die Stimulation der Darmschleimhaut und des Tumorwachstums durch Gastrin und dessen Vorstufen über andere Gastrin-bindende Rezeptoren berichtet (Baldwin und Schulkes, 1998, Ahmed et al., 2004, Copps et al., 2007), welche auch für die Bindung der Sonde Mini-DY an die Darmschleimhaut verantwortlich sein könnten. Ebenfalls ist über das Vorkommen von CCK₂-Rezeptoren in der gesamten glatten Muskulatur des Gastrointestinaltrakts berichtet worden (Noble et al., 1999), welches das starke Darmsignal erklären könnte. Behr et al. ermittelten zudem eine starke Aufnahme von Minigastrin über die Gallenblase und erklärten so das von ihnen ermittelte Signal im Darm über die biliäre Exkretion von Minigastrin in den Darm. Auch der schon beschriebene und vermutlich durch das Fluorophor bedingte Abbau von Mini-DY in der Leber und die nachfolgende hepatobiliäre Exkretion kann die Anreicherung von Mini-DY im Darm erklären. Bei der Anwendung von Mini-DY für die Detektion von CCK₂-Rezeptor-exprimierenden Tumoren mittels planarer optischer Bildgebung ist demzufolge auf eine räumliche Trennung des darzustellenden Tumors zum Magen und Darm zu achten, da die hohen Signalintensitäten aus beiden Organen eine Detektion von sich in der Nähe befindenden Tumoren erschweren. Das Schilddrüsenkarzinom erfüllt diese Bedingung und kann durch seine oberflächliche Lage außerdem gut mittels planarer Bildgebung erreicht werden. Aber auch Organe, die sich in der Nähe des Magens oder Darms und in tieferen Körperstrukturen befinden, könnten mittels tomografischer Bildgebung untersucht werden, da hierdurch besser abgrenzbar ist, von welchem Organ die Fluoreszenz ermittelt wird.

Ein nur geringer Anstieg der Fluoreszenzintensität in Lunge, Milz und Herz der Tiere, welchen Mini-DY injiziert wurde, im Vergleich zu den Tieren ohne Kontrastmittelgabe, spricht für eine geringe Anreicherung der Sonde in diesen Organen. Vor allem die geringe Anreicherung in der Lunge ist vorteilhaft für den Einsatz von Mini-DY für die Detektion von Bronchialkarzinomen mittels tomografischer Bildgebung, da eine genügende Abgrenzung zum gesunden Nachbargewebe erreicht wird. Die Untersuchung der Mini-DY-Anreicherung in weiteren Organen, welche CCK₂-Rezeptor-exprimierende Tumore ausbilden können, wie zum Beispiel Eierstöcke, Schilddrüse und Pankreas, muss noch durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass nach i.v.-Applikation von Mini-DY eine Darstellung CCK₂-Rezeptor-exprimierender Tumoren mittels NIRF-Kleintierscanner

grundsätzlich möglich war. Jedoch konnten Rezeptor-positive Tumoren von Rezeptor-negativen Tumoren und mit Minigastrin geblockten Tumoren nicht in dem Maße voneinander abgegrenzt werden, wie ausgehend von den *in vitro*-Versuchen erwartet wurde. Die ungenügende Abgrenzung ist zum einen auf eine zu hohe unspezifische Sondenaufnahme zurückzuführen. Zum anderen könnten auch eine ungenügende Aufnahme von Mini-DY in den HT29-Tumor durch die möglicherweise *in vivo* verringerte CCK₂-Rezeptor-Expression bzw. eine ungenügende Bindung an die Rezeptoren begründet sein. Letzteres sollte durch PCR- und Western-Blot-Analysen der verwendeten Tumore und die Durchführung von Stabilitäts- und Bindungsstudien genauer untersucht werden. Auch die Wahl eines anderen Zellmodells könnte die Abgrenzung zu den CCK₂-Rezeptor-negativen Tumoren erhöhen. Die Durchführung einer tomografischen optischen Bildgebung mittels Mini-DY, sowie die Kopplung des Fluorophors DY-676 an neu zu synthetisierende Minigastrin-Dimere könnten zudem zu einer Erhöhung des Tumor/Muskel-Verhältnisses führen. Ebenso können die durch das Fluorophor DY-676 bedingten Effekte, wie vor allem die Bindung an Plasmaproteine und Membranproteine, genauer untersucht und verringert werden. Nach entsprechenden weiterführenden Untersuchungen und der Gewährleistung einer ausreichenden Spezifität und Sensitivität der Sonde ist der Einsatz von Mini-DY für die Detektion CCK₂-exprimierender Tumoren in der Klinik mit den für die optische Bildgebung bekannten Vorteilen einer schonenden, nichtinvasiven, frühzeitigen und hochauflösenden Darstellung denkbar. So könnten mittels NIRF-Bildgebung medulläre Schilddrüsenkarzinome detektiert und von nicht-medullären Schilddrüsenkarzinomen und parathyroiden Karzinomen unterschieden werden, da letztere den CCK₂-Rezeptor nicht ausbilden (Reubi et al., 1997). Mittels Fluoreszenz-Bildgebung im Rahmen von sowohl endoskopischen Verfahren als auch intraoperativ bzw. über tomografische Bildgebung könnten kleinzellige Bronchialkarzinome dargestellt und von nichtkleinzelligen unterschieden werden. Dies wird durch die sehr geringe Anreicherung der Sonde in gesundem Lungengewebe begünstigt. Ebenso ist die Detektion stromaler Ovarialkarzinome denkbar, wobei zuvor die Anreicherung von Mini-DY in gesunden Eierstöcken untersucht werden müsste. Bei Überwindung der Blut-Hirn-Schranke könnten auch Astrozytome mittels Mini-DY dargestellt werden. Dabei erwies sich die Nutzung der optischen Bildgebung im Gegensatz zur szintigrafischen als schonender, da Patient und Umgebung keiner radioaktiven Strahlung ausgesetzt würden. Zudem wäre sie gegenüber der szintigrafischen Bildgebung auch weniger aufwendig, da das Kontrastmittel sehr einfach herzustellen und nicht von einer Halbwertszeit eines Radionuklids abhängig ist.

7 Literaturverzeichnis

Achilefu S, Dorshow RB, Bugaj JE, Rajagopalan R. 2000. Novel receptor targeted fluorescent contrast agents for in vivo tumor imaging. First report of small-peptide targeting using NIR fluorescent dyes. *Invest Radiol.* Aug;35(8):479-85

Achilefu S, Jimenez HN, Dorshow RB, Bugaj JE, Webb EG, Wilhelm RR, Rajagopalan R, Johler J, Erion JL. 2002. Synthesis, in vitro receptor binding, and in vivo evaluation of fluorescein and carbocyanine peptide-based optical contrast agents. *J Med Chem.* May 9; 45(10):2003-15.

Ahmed S, Budai B, Heredi-Szabo K, Farkas J, Toth G, Murphy RF, Lovas S. 2004. High and low affinity receptors mediate growth effects of gastrin and gastrin-Gly on DLD-1 human colonic carcinoma cells. *FEBS Lett.* Jan 2;556(1-3):199-203.

Ahmed SI, Wibowo F, Gembitsky DS, Bozso Z, Murphy RF, Lovas S. 2001. Importance of the C-terminal phenylalanine of gastrin for binding to the human CCK(2) receptor. *J Pept Res.* Oct;58(4):332-7.

Angelmahr M. 2003. Die Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie. Ein Seminarvortrag im Rahmen des Physikalisch- Chemischen Forschungspraktikum. Vortragsdatum 20.05.2003.<http://www.pci.uni-Heidelberg.de/pci/fpraktikum/ss03/Martin%20Angelmahr%20%20Grundlagen%20der%20Fluoreszenzspektroskopie.pdf>

Baldwin GS und Shulkes A. 1998. Gastrin, gastrin receptors and colorectal carcinoma. *Gut.* Apr;42(4):581-4. Review

Ballou B, Fisher GW, Hakala TR, Farkas DL. 1997. Tumor Detection and Visualization Using Cyanine Fluorochrome-Labeled Antibodies. *Biotechnol Prog.* Sep-Oct;13(5):649-58

Becker A, Hessenius C, Bhargava S, Grotzinger C, Licha K, Schneider-Mergener J, Wiedenmann B, Semmler W. 2000. Cyanine dye labeled vasoactive intestinal peptide and somatostatin analog for optical detection of gastroenteropancreatic tumors. *Ann N Y Acad Sci.* 921:275-8.

Becker A, Hessenius C, Licha K, Ebert B, Sukowski U, Semmler W, Wiedenmann B, Grötzinger C. 2001. Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands. *Nat Biotechnol.* Apr;19(4):327-31

Behr TM, Jenner N, Behe M, Angerstein C, Gratz S, Raue F, Becker W. 1999. Radiolabeled peptides for targeting cholecystokinin-B/gastrin receptor-expressing tumors. *J Nucl Med.* 1999 Jun;40(6):1029-44.

Behe M, Kluge G, Becker W, Gotthardt M, Behr TM. 2005. Use of polyglutamic acids to reduce uptake of radiometal-labeled minigastrin in the kidneys. *Journal of Nuclear Medicine.* Jun; 46(6):1012-1015, Jun

Bellier B, Dugave C, Etivant F, Genet R, Gigoux V, Garbay C. 2004. Synthesis and biological characterisation of [3H]BBL454, a new CCK2 selective radiolabelled agonist displaying original pharmacological properties. *Bioorg Med Chem Lett.* Jan 19;14(2):369-72.

Bhargava S. 2002. Carbocyanin-markierte Derivate des Vasoaktiven Intestinalen Peptids für die Tumordiagnostik. Dissertation. Humboldt-Universität Berlin: Medizinische Fakultät

Breeman WA, de Jong M, Erion JL, Bugaj JE, Srinivasan A, Bernard BF, Kwekkeboom DJ, Visser TJ, Krenning EP. 2002. Preclinical comparison of (111)In-labeled DTPA- or DOTA-bombesin analogs for receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy. *J Nucl Med.* Dec;43(12):1650-6.

Bremer C, Ntziachristos V, Mahmood U, Tung CH, Weissleder R. 2001. Fortschritte in der optischen Bildgebung. *Radiologe.* 41:131-37.

Chen X, Conti PS, Moats RA. 2004. In vivo near-infrared fluorescence imaging of integrin $\alpha v \beta 3$ in brain tumor xenografts. *Cancer Res.* Nov 1;64(21):8009-14.

Choe YS und Lee KH. 2007. Targeted in vivo imaging of angiogenesis: present status and perspectives. *Curr Pharm Des.* 13(1):17-31. Review.

Colucci R, Blandizzi C, Tanini M, Vassalle C, Breschi MC, Del Tacca M. 2005. Gastrin promotes human colon cancer cell growth via CCK-2 receptor-mediated cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 production. *Br J Pharmacol.* Feb;144(3):338-48.

Copps J, Ahmed S, Murphy RF, Lovas S. 2007. Gastrin 1-6 promotes growth of colon cancer cells through non-CCK receptors. *Peptides.* Mar;28(3):632-5. Epub 2006 Nov 28.

Deissler V. 2006. Molekulare NIRF-Bildgebung von Makrophagen nach Markierung mit fluorochrombeladenen Liposomen: *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen. Dissertation. Friedrich – Schiller – Universität Jena: Medizinische Fakultät

Dockray GJ, Varro A, Dimaline R, Wang T. 2001. The gastrins: their production and biological activities. *Annu Rev Physiol.* 63:119-39. Review.

Edkins JS. 1905. On the chemical mechanism of gastric secretion. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 76:376

Ferrari M, Mottola L, Quaresima V. 2004. Principles, techniques, and limitations of near infrared spectroscopy. *Can J Appl Physiol.* Aug; 29(4):463-87

Goldsmith SJ. 1997. Receptor imaging: competitive or complementary to antibody imaging. *Semin Nucleic Med.* Apr;27(2):85-93. Review

Gratton E, Toronov V, Wolf U, Wolf M, Webb A. 2005. Measurement of brain activity by near-infrared light. *J Biomed Opt.* Jan-Feb;10(1):11008. Review

Hansch A, Frey O, Hilger I, Sauner D, Haas M, Schmidt D, Kurrat C, Gajda M, Malich A, Brauer R, Kaiser WA. 2004. Diagnosis of arthritis using near-infrared fluorochrome Cy5.5. *Invest Radiol.* Oct;39(10):626-32.

Hebden JC. 2003. Advances in optical imaging of the newborn infant brain. *Psychophysiology.* Jul;40(4):501-10

Hellmich MR, Rui XL, Hellmich HL, Fleming RY, Evers BM, Townsend CM Jr. 2000. Human colorectal cancers express a constitutively active cholecystinin-B/gastrin receptor that stimulates cell growth. *J Biol Chem.* Oct 13;275(41):32122-8.

Hopt A. 2004. Biophysikalische Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des Prionproteins als Metalloprotein. Dissertation. LMU München: Medizinische Fakultät

Hilger I, Haag R, Czerney P, Wenzel M, Hansch A, Fritsche C, Kaiser WA. 2004. Characterization of near infrared fluorescent dyes for in vivo applications. *European Radiology* 14, Supl. 2, S 330. Vortrag im Rahmen des „European Congress of Radiology“ in Wien, Österreich.

Ivy AC und Oldberg E. 1928. A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation. *Am J Physiol* 86:599–613.

Jain RK. 1994. Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci Am.* Jul;271(1):58-65

Jensen RT. 2002. Involvement of cholecystinin/gastrin-related peptides and their receptors in clinical gastrointestinal disorders. *Pharmacol Toxicol.* Dec;91(6):333-50. Review

Ke S, Wen X, Gurfinkel M, Charnsangavej C, Wallace S, Sevick-Muraca EM, Li C. 2003. Near-infrared optical imaging of epidermal growth factor receptor in breast cancer xenografts. *Cancer Res.* Nov 15;63(22):7870-5.

Langer M und Beck-Sickinger AG. 2001. Peptides as carrier for tumor diagnosis and treatment. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* May;1(1):71-93. Review.

Lewis B, Kent und Köpcke W. 1997: Students's t-Test-Programm der Universität Münster: <http://imib.uni-muenster.de/fileadmin/template/conf/imib/lehre/skripte/biomasche/bio/ttestu.html>, erstellt am 08.07.2002, eingesehen am 02.02.2007

Licha K, Riefke B, Ntziachristos V, Becker A, Chance B, Semmler W. 2000. Hydrophilic cyanine dyes as contrast agents for near-infrared tumor imaging: synthesis, photophysical properties and spectroscopic in vivo characterization. *Photochem Photobiol. Sep*; 71(3):392-8.

Li C, Wang W, Wu Q, Ke S, Houston J, Sevick-Muraca E, Dong L, Chow D, Charnsangavej C, Gelovani JG. 2006. Dual optical and nuclear imaging in human melanoma xenografts using a single targeted imaging probe. *Nucl Med Biol.* Apr;33(3):349-58.

Lin YC, Hung GU, Luo TY, Chen CH, Hsia CC, Hen SL, Ho YJ, Lin WY. 2006. A comparison of biodistribution between ¹¹¹In-DTPA octreotide and ¹¹¹In-DOTATOC in rats bearing pancreatic tumors. *J Vet Med Sci.* Apr;68(4):367-71.

Linkenheld C. 2002. <http://www.mikroskopie.de/kurse/fluoreszenz/elektron.html>, erstellt 2002, eingesehen am 8.2.2006

Liu S und Edwards DS. 1999. ^{99m}Tc-Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals. *Chem Rev.* Sep 8;99(9):2235-68.

Löffler G und Petrides PE. 1997. Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag GmbH; Auflage: 5. vollst. überarb. Aufl. (1997)

Martin MM und Lindqvist L. 1975. The pH-dependence of fluorescein fluorescence. *Journal of Luminescence* 10, 381-90.

Matsushima Y, Kinoshita Y, Nakata H, Inomoto-Naribayashi Y, Asahara M, Kawanami C, Nakamura A, Ito M, Matsui T, Fujiwara T, et al. 1994. Gastrin receptor gene expression in several human carcinomas. *Jpn J Cancer Res.* Aug;85(8):819-24.

Maul FD. 2003. Nuklearmedizin und nuklearmedizinische Meßtechniken 1 und 2. Vorlesung. http://www.ibt.uni-karlsruhe.de/download/05-mess-Einfuehrung_6.pdf. erstellt am 13.07.2003. eingesehen am 26.03.2007

Menozzi D, Gardner JD and Maton PN (1989) Properties of receptors for gastrin and CCK on gastric smooth muscle cells. *Am J Physiol* 257:G73–G79.

Neri D, Carnemolla B, Nissim A, Leprini A, Querze G, Balza E, Pini A, Tarli L, Halin C, Neri P, Zardi L, Winter G. 1997. Targeting by affinity-matured recombinant antibody fragments of an angiogenesis associated fibronectin isoform. *Nat. Biotechnol.* Nov;15(12):1271-5

Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwejn J, Seroogy KB, Hamon M, Roques BP. 1999. Structure, Distribution, and Functions of Cholecystokinin Receptors. *International Union of Pharmacology.* Dec; 51(4):745-781. Review

Nock BA, Maina T, Behe M, Nikolopoulou A, Gotthardt M, Schmitt JS, Behr TM, Macke HR. 2005. CCK-2/gastrin receptor-targeted tumor imaging with (99m)Tc-labeled minigastrin analogs. *J Nucl Med.* Oct;46(10):1727-36

Ntziachristos V, Ripoll J, Wang LV, Weissleder R. 2005. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nature Biotechnology.* Mar; 23(3):313-320

Ntziachristos V, Yodh AG, Schnall M, Chance B. 2000. Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 14;97(6):2767-72

Opderbeck T. 2002. Molekulare Bildgebung - molecular imaging: die neue Hoffnung zur Früherkennung von Krankheiten. *Innovation News,* Ausgabe 3/2002

Paech W. 2001. Baader Planetarium. <http://www.sbig.de/universitaet/glossar-htm/binning.htm>. Stand 11/2001. Eingesehen am 28.02.07.

Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 1997. 258. Auflage. Verlag Walter de Gruyter.

Reichenbach JR, Hopfe J, Rauscher A, Wurdinger S, Kaiser WA. 2005. Subtraction of in-phase and opposed-phase images in dynamic MR mammography. *J Magn Reson Imaging.* May;21(5):565-75.

Reubi JC, Schaer JC, Waser B. 1997. Cholecystokinin(CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res.* Apr 1;57(7):1377-86.

Reubi JC. 2003. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev.* Aug;24(4):389-427. Review.

Regulla D, Griebel J, Noßke D, Bauer B, Brix G. 2003. Erfassung und Bewertung der Patientenexposition in der diagnostischen Radiologie und Nuklearmedizin. *Z. Med. Phys.* 13: 127–135

Serafini AN. 1993. From monoclonal antibodies to peptides and molecular recognition units: an overview. *J Nucl Med.* Mar;34(3 Suppl):533-6. Review.

Sevick-Muraca EM, Houston JP, Gurfinkel M. 2002. Fluorescence-enhanced, near infrared diagnostic imaging with contrast agents. *Curr Opin Chem Biol.* 2002 Oct; 6(5):642-50. Review

Smith AM und Watson SA. 2000. Gastrin and colorectal cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* 14: 1231±1247.

Smith-Jones PM, Stolz B, Albert R, Knecht H, Bruns C. 1997. Synthesis, biodistribution and renal handling of various chelate-somatostatin conjugates with metabolizable linking groups. *Nucl Med Biol.* Nov;24(8):761-9.

Szeimies RM, Lorenzen T, Karrer S, Abels C, Plettenberg A. 2001. Photochemotherapie kutaner Aids-assoziiierter Kaposi-Sarkome mit Indocyaningrün und Laserlicht. *Hautarzt.* 52:322–326

Statistisches Bundesamt. 2006. Pressemitteilung des statistischen Bundesamts vom 15.9.2006, <http://www.destatis.de/presse/deutsch/pm2006/p3830092.htm>, eingesehen am 13.2.2007

Taillefer M-C und Denault AY. 2005. Cerebral near-infrared spectroscopy in adult heart surgery: systematic review of its clinical efficacy. *Can J Anaesth.* Jan;52(1):79-87. Review.

Tarasova NI, Wank SA, Hudson EA, Romanov VI, Czerwinski G, Resau JH, Michejda CJ. 1997. Endocytosis of gastrin in cancer cells expressing gastrin/CCK-B receptor. *Cell Tissue Res.* Feb;287(2):325-33.

Thakur ML, Aruva MR, Garipey J, Acton P, Rattan S, Prasad S, Wickstrom E, Alavi A. 2004. PET imaging of oncogene overexpression using ⁶⁴Cu-vasoactive intestinal peptide (VIP) analog: comparison with ^{99m}Tc-VIP analog. *J Nucl Med.* Aug;45(8):1381-9.

Tracy HJ und Gregory RA. 1964. Physiological properties of a series of synthetic peptides structurally related to gastrin I. *Nature*. Dec 5;204:935-8.

Tromberg BJ, Cerussi A, Shah N, Compton M, Durkin A, Hsiang D, Butler J, Mehta R. 2005. Imaging in breast cancer: Diffuse optics in breast cancer: detecting tumors in premenopausal women and monitoring neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res*. Nov; 7(6):279-85

Vanderhaeghen JJ, Signeau JC and Gepts W. 1975. New peptide in vertebrate CNS reacting with antigastrin antibodies. *Nature (Lond)* 257:601–605.

von Guggenberg E, Behe M, Behr TM, Saurer M, Seppi T, Decristoforo C. 2004. ^{99m}Tc-labeling and in vitro and in vivo evaluation of HYNIC- and (Nalpha-His)acetic acid-modified [D-Glu1]-minigastrin. *Bioconjug Chem*. Jul-Aug;15(4):864-71.

von Wallbrunn A, Holtke C, Zuhlsdorf M, Heindel W, Schafers M, Bremer C. 2006. In vivo imaging of integrin $\alpha\beta_3$ expression using fluorescence-mediated tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Nov 28

Weissleder R und Mahmood U. 2001. Molecular imaging. *Radology*. May;219(2):316-33. Review

Ye Y, Bloch S, Xu B, Achilefu S. 2006. Design, synthesis, and evaluation of near infrared fluorescent multimeric RGD peptides for targeting tumors. *J Med Chem*. Apr 6;49(7):2268-75.

8 Anhang

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danke ich:

- Dem Institutsdirektor Prof. Dr. med. Dipl.-Chem. Werner A. Kaiser für die herzliche Aufnahme im Institut
- PD Dr. rer. nat. I. Hilger für die Bereitstellung des Themas und die zuverlässige und konstruktive Betreuung
- Dr. rer. nat. M.-R. Lisy für seine wertvollen Denkanstöße, sein geduldiges und fachkompetentes Beantworten meiner Fragen, sowie seine Motivation und moralische Unterstützung
- Frau Yvonne Heyne und Frau Brigitte Maron für die Einführung in die Arbeitstechniken der Zellkultur, ihre hilfsbereite Unterstützung und ihre aufbauenden Worte
- Fa. DYOMICS, Jena, für die Bereitstellung des Fluorochroms DY-676
- Dr. Martin Béhé (Klinik für Nuklearmedizin, Phillips-Universität Marburg) für die Bereitstellung des Minigastrins und die freundliche Beantwortung meiner vielen Fragen
- Dr. rer. nat. M. Förster (AG Pneumologie) für die freundliche Bereitstellung des FACS
- Prof. Dr. med. A. Habenicht (Institut für Vaskuläre Medizin) für die Bereitstellung des CLSM
- Dr. Harald Schubert und Mitarbeitern (Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena) für die gute Zusammenarbeit

-
- Meinen lieben Mitdoktoranden in der Arbeitsgruppe, vor allem Nancy Richter für ihre geduldige und selbstlose Hilfe sowie Jörn Winter, Verena Deissler und Claudia Thomas für ihre konstruktiven Ratschläge und guten Gespräche
 - Meinen Eltern Eva-Maria und Ulrich Laabs für ihre moralische und nicht zuletzt auch finanzielle Unterstützung, ohne die mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären
 - Meinem lieben Freund Silvio Kleinsteuber, für seine unglaubliche Hilfe, Ermutigung und Geduld
 - Der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung für die monatliche finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums, das diese Arbeit erst ermöglichte

Lebenslauf

Name: Laabs
Vorname: Elisabeth
Geburtsdatum: 07.08.1981
Geburtsort: Erfurt
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Bildungsweg:

September 1988 – Juli 1991	Besuch der Heinrich-Heine-Schule, Erfurt
September 1991 – Juli 1992	Besuch der Grundschule 30, Erfurt
September 1992 – Februar 1997	Besuch des Heinrich-Mann-Gymnasiums, Erfurt
März 1997 - Juni 2000	Besuch des Königin-Luise-Gymnasiums, Erfurt
Juni 2000	Abitur
Oktober 2000 – März 2007	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
August 2002	Ärztliche Vorprüfung
August 2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2005-März 2007	Durchführung der Experimente am Institut für Interventionelle und Diagnostische Radiologie, Jena, und Erstellen der Promotion
April 2007 – April 2008	Absolvieren des Praktischen Jahres an Lehrkrankenhäusern der Technischen Universität Dresden
April 2008	Beendigung des Studiums mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit August 2008	Elternzeit

-
- Preis:** 2. Preis für den Vortrag „NIRF-Bildgebung von Cholecystokinin-2-Rezeptor-exprimierenden Tumoren“ am 3. Tag der Nachwuchswissenschaftler des FZL Jena am 19.06.2006
- Stipendium:** Promotionsstipendium der Else-Krüner-Fresenius-Stiftung Mai 2006
- Mai 2007

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. I. Hilger, Dr. rer. nat. M.-R. Lisy
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Dresden, den 21.10.07

Elisabeth Laabs, Verfasserin